

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA NA
DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES EM MATRIZES AMBIENTAIS**

CURITIBA

2017

PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA NA
DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES EM MATRIZES AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química Analítica,
no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

Co-orientador: Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S587a

Silveira, Priscila Lagner da

Avaliação de técnicas de extração em fase líquida na determinação de micropoluentes em matrizes ambientais / Priscila Lagner da Silveira. – Curitiba, 2017.

105 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientador: Noemi Nagata – Coorientador: Patricio Guillermo Peralta-Zamora,.

Bibliografia: p. 96-105.

1. Pesticidas. 2. Pesticidas – Aspectos ambientais. 3. Misturas (Química). 4. Cromatografia a líquido. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nagata, Noemi . III. Peralta-Zamora, Patricio Guillermo . IV. Título.

CDD: 541.393

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA NA
DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES EM MATRIZES
AMBIENTAIS**

por

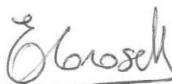
PRISCILA LAGNER DA SILVEIRA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof.ª Dr.ª Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Dep. de Química – UFSC



Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 11 de agosto de 2017.

Dedico este trabalho à minha querida mãe Arlete, pelo amor e auxílio ao longo desta jornada.

Ao meu amado marido Leandro, por tornar a minha vida mais leve e por todo apoio e motivação que me permitiram concluir esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente à minha amada mãe Arlete, por estar ao meu lado em todas os momentos e por me incentivar a seguir em frente. Peço desculpas por todas as vezes que me ausentei por conta dos estudos, mas aprendi com vocês que nada de real valor se conquista sem sacrifícios.

Ao meu amado marido Leandro pelo apoio, atenção, carinho e tudo mais que não pode ser descrito apenas por palavras. Você é o meu porto seguro, sem o qual não teria chegado ao fim desta etapa. Muito obrigada!

Aos meus queridos orientadores Prof^a. Dr^a. Noemi Nagata e Prof^o. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora pelos ensinamentos, pela amizade, orientação, compreensão e por toda a afeição ao longo de minha vida acadêmica. Obrigada!

A todos os professores que tive desde a infância até hoje, por me incentivarem na busca pelo conhecimento.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate pela inestimável contribuição neste projeto, sempre pontuando melhoras desde a correção do relatório anual até o exame de qualificação. Obrigada por sua dedicação!

Ao Prof. Dr. Eduardo Carasek por aceitar participar da Banca de Defesa e pelas valiosas contribuições.

Aos amigos dos laboratórios GAQQ, Tecnotrater e LABQAM, por tornarem esta etapa mais leve e descontraída, em especial à Alecsandra Santos e à Sandra Stets por me acolherem no início da minha caminhada na química analítica.

À Bianca do Amaral, uma grande amiga e parceira de trabalho que a vida colocou no meu caminho. Eu não seria nada hoje sem as suas contribuições desde a cromatografia até a vida pessoal. Espero ser para alguém um dia o que você é para mim. Obrigada!

Ao CNPQ e à CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, obrigada!

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes

Isaac Newton

RESUMO

Nas últimas décadas o consumo de pesticidas cresceu consideravelmente, devido à necessidade de promover o controle de pragas nas lavouras, visando suprir a demanda de produtos agrícolas. Este elevado consumo associado ao emprego e ao descarte inadequado pode levar à contaminação de águas naturais e para o consumo. Neste contexto, é essencial o monitoramento de pesticidas no ambiente. Assim, no presente trabalho foram avaliados dois sistemas de extração, via microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e microextração líquido-líquido homogênea (HLLME) para determinar diuron (DIU, $\log K_{ow}$ 2,9), teflubenzuron (TFB, $\log K_{ow}$ 4,3), atrazina (ATZ, $\log K_{ow}$ 2,7) e dois de seus metabólitos: desiopropil-atrazina (DIA, $\log K_{ow}$ 1,1) e desetil-atrazina (DEA, $\log K_{ow}$ 1,5) em matrizes aquosas naturais. Ensaio preliminares revelaram melhores recuperações via DLLME para os analitos mais polares, DIA e DEA, ao se adicionar diclorometano (DCM, $\log K_{ow}$ 1,3 - um solvente de maior polaridade), à mistura de solventes extrator:dispersor composta por clorofórmio:acetonitrila (CLO, $\log K_{ow}$ 2,0:ACN, $\log K_{ow}$ -0,33). Logo, a fim de se obter adequada polaridade da mistura de solventes na DLLME, para a determinação simultânea dos analitos (com ampla faixa de polaridade), foi desenvolvida uma metodologia DLLME com duplo solvente. O estabelecimento da rotina de extração foi investigado via modelagem de misturas para a determinação da melhor proporção entre os solventes extratores (CLO e DCM) e o solvente dispersor (ACN), limitando a soma a 100 % em massa (1,5 g). Os ensaios foram realizados pela extração de 5,00 mL de amostra aquosa fortificada com todos os analitos, preparadas em 10 % (m/v) de NaCl. Após a adição da mistura CLO:DCM:ACN nas proporções de interesse, as amostras foram agitadas em vortex por 30 s e centrifugadas (6 min a 4400 rpm). Em seguida, todo o extrato foi coletado, evaporado sob fluxo de N_2 , reconstituído na fase móvel, e analisado por LC-DAD. Por meio de um planejamento Simplex Lattice na região correspondente às melhores recuperações, foi possível obter superfícies de resposta significativas com 95% de confiança de acordo com a análise de variância (ANOVA). A sobreposição das superfícies permitiu detectar a melhor proporção em massa entre os solventes: 47,5%:5%:47,5% (CLO:DCM:ACN). Portanto, nas condições otimizadas foram empregados 481 μ L de CLO, 56,6 μ L de DCM e 906 μ L de ACN, garantindo recuperações de $49,4 \pm 1,4$ % para DIA, $73,2 \pm 1,2$ % DEA, $95,1 \pm 2,4$ % ATZ, $94,7 \pm 2,2$ % DIU e de $74,9 \pm 1,4$ % TFB. O método foi aplicado com sucesso na análise de amostras de águas naturais coletadas na bacia hidrográfica do rio Tibagi, no estado do Paraná, mostrando-se robusto, de acordo com o teste de Youden, preciso, com coeficientes de variação < 14 %, e exato, com desvio padrão inferior a 9 % nos ensaios de recuperação. Baixos limites de detecção foram alcançados (0,015 à 0,036 μ g L⁻¹) além de limites de quantificação iguais a 0,049 μ g L⁻¹ para DIA, 0,014 μ g L⁻¹ para DEA, 0,21 μ g L⁻¹ para ATZ, 0,45 μ g L⁻¹ para DIU e de 1,20 μ g L⁻¹ para TFB.

Palavras-chave: Pesticidas. Águas naturais. Modelagem de misturas. DLLME. LC-DAD.

ABSTRACT

In the last decades, pesticides consumption has grown considerably due to the need of controlling pest in crops, in order to attend the growing demand for agriculture products. The excessive consumption of pesticides, associated with their inadequate disposal can lead to the contamination of both natural and drinking waters. In this context, the monitoring of pesticides in the environment is essential. In the present work two different extraction systems were evaluated, using liquid-liquid dispersive microextraction (DLLME) and homogeneous liquid-liquid microextraction (HLLME) to determine diuron (DIU, $\log K_{ow}$ 2.9), teflubenzuron (TFB, $\log K_{ow}$ 4.3), atrazine (ATZ, $\log K_{ow}$ 2.7) and two of its metabolites: deisopropyl atrazine (DIA, $\log K_{ow}$ 1.1) and desethyl-atrazine (DEA, $\log K_{ow}$ 1.5) in natural aqueous matrices. Preliminary tests revealed better DLLME recoveries for the more polar analytes, DIA and DEA, when dichloromethane, which is a solvent with higher polarity (DCM, $\log K_{ow}$ 1.3), was added to the extractor and to the disperser solvent mixture composed of chloroform: acetonitrile (CLO, $\log K_{ow}$ 2.0: ACN, $\log K_{ow}$ -0.33). Therefore, to obtain the proper polarity for the DLLME solvent mixture in the simultaneous determination of the analytes, which present a broad polarity range, a binary solvent DLLME method was developed. In order to determine the best ratio between the extractor solvents (CLO and DCM) and the disperser solvent (ACN), the extraction routine was investigated by modeling mixtures design, setting 100 % as 1.500 g. The assays were performed by extraction of 5.00 mL of an aqueous sample fortified with all analytes, prepared in 10 % (w / v) NaCl. After addition of the CLO: DCM: ACN mixtures in the proportions established by the modeling mixture design, the samples were vortexed for 30 s and centrifuged for 6 min at 4400 rpm. Afterwards, the sedimented phase was entirely collected, dried under a gentle flow of nitrogen, re-dissolved in the mobile phase and analysed by LC-DAD. Simplex Lattice design performed in the region corresponding to the best recoveries allowed achieving significant response surfaces with 95% confidence according to the analysis of variance (ANOVA). The overlapping surfaces permitted the detection of the best mass ratio among the solvents: 47.5%: 5%: 47.5% (CLO: DCM: ACN). Therefore, 481 μL of CLO, 56.6 μL of DCM and 906 μL of ACN were used under optimized conditions, guaranteeing recoveries of 49.4 ± 1.4 % for DIA, 73.2 ± 1.2 % DEA, 95.1 ± 2.4 % ATZ, 94.7 ± 2.2 % DIU e de $74,9 \pm 1,4$ % TFB. The method was successfully applied in the analysis of natural waters samples collected in Tibagi river basin (Paraná State), presenting adequate accuracy (standard deviation lower than 9% in the recovery assays), precision (coefficients of variation <14%), and robustness consistent with the Youden test. Low limits of detection were achieved (0.015 to 0.036 $\mu\text{g L}^{-1}$) in addition to limits of quantification equal to 0.049 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DIA, 0.014 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DEA, 0.21 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ATZ, 0.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ for DIU and 1.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TFB.

Key-words: Pesticides. Natural waters. Mixture design. DLLME. LC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO HOMOGÊNEA (HLLME).....	30
FIGURA 2 - DIAGRAMA DE FASES ETANOL-CLOROFÓRMIO-ÁGUA.....	31
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME).....	34
FIGURA 4 - DIAGRAMAS TERNÁRIOS PARA OS PRINCIPAIS TIPOS DE MODELAGEM DE MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES. A) EXEMPLO GENÉRICO DE UMA MODELAGEM DE MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES. B) SIMPLEX LATTICE DESIGN. C) SIMPLEX CENTROID DESIGN.....	39
FIGURA 5 - SISTEMA DE SECAGEM DE AMOSTRAS SOB FLUXO DE N ₂	46
FIGURA 6 - USO DO SOLO NA REGIÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TIBAGI – PARANÁ.....	48
FIGURA 7 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS DO MÉTODO DLLME-LC-DAD.....	49
FIGURA 8 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PELO MÉTODO LC-DAD OTIMIZADO. ANÁLISE DE UMA MISTURA DOS PADRÕES (1000 µg L ⁻¹) PREPARADA NA FASE MÓVEL (ACETONITRILA:ÁGUA, 40:60, v/v). MONITORAMENTO EM A) 200 nm; B) 215 nm; C) 223 nm; D) 254 nm.....	55
FIGURA 9 - A) CURVAS ANALÍTICAS MÉDIAS PARA DIA (215 nm), DEA (215 nm), ATZ (223 nm), DIU (254 nm) E TFB (200 nm). B) AMPLIAÇÃO DAS CURVAS. MÉTODO CROMATOGRÁFICO 1.....	57
FIGURA 10 - CROMATOGRAMAS TÍPICOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS 1 E 2. MONITORAMENTO EM 223 nm.....	59

FIGURA 11 - ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES E DISPERSORES. A) DLLME CONVENCIONAL B) DLLME COM DUPLO SOLVENTE EXTRATOR. SIGLAS: CLOROFÓRMIO (CLO), DICLOROMETANO (DCM), ETANOL (ETOH), METANOL (MEOH), TOLUENO (TOL), ACETONITRILA (ACN).....	61
FIGURA 12 - PROPORÇÕES EM MASSA EMPREGADAS NA MODELAGEM 1. O ENSAIO 15, DESTACADO EM VERMELHO, FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.....	65
FIGURA 13 - PROPORÇÕES EM MASSA EMPREGADAS NA MODELAGEM 2 COM RESTRIÇÃO DE LIMITES INFERIORES E SUPERIORES DOS SOLVENTES. O ENSAIO 10, DESTACADO EM VERMELHO, FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.....	67
FIGURA 14 - PROPORÇÕES EM MASSA EMPREGADAS PARA A OBTENÇÃO DO MODELO SIGNIFICATIVO PARA TFB. EM PRETO AS CONDIÇÕES DA MODELAGEM 2 E EM AZUL AS CONDIÇÕES REFERENTES AOS ENSAIOS 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14 E 15 DA MODELAGEM 1.....	69
FIGURA 15 - CURVAS DE NÍVEL DO MODELO QUADRÁTICO PARA RECUPERAÇÃO (%) DOS ANALITOS EM FUNÇÃO DAS PROPORÇÕES DE SOLVENTE CLO:DCM:ACN. A) DIA; B) DEA; C) ATZ; D) DIU. AS SETAS BRANCAS INDICAM A MELHOR CONDIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANALITOS.....	72
FIGURA 16 - GRÁFICOS DE PARETO PARA OS ANALITOS, OBTIDOS PARA OS MODELOS QUADRÁTICOS PARA DIA, DEA, ATZ E DIU.....	73
FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA MASSA TOTAL DE SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS POR DLLME (47,5 %CLO, 5,0 %DCM E 47,5 %ACN)	75
FIGURA 18 - CROMATOGRAMAS TÍPICOS DAS AMOSTRAS REAIS	

	(215 nm) APÓS DLLME. A) COLETA 1 – PROVAS EM BRANCO E FORTIFICADAS COM 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE DIA E 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DOS OUTROS ANALITOS; B) COLETA 2 - PROVAS EM BRANCO E FORTIFICADAS COM 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE CADA ANALITO.....	82
FIGURA 19 -	CROMATOGRAMA TÍPICO DE AMOSTRA REAL (IAPÓ-COLETA 2) APÓS DLLME, ANÁLISE DA AMOSTRA SEM FORTIFICAÇÃO E AMOSTRA FORTIFICADA COM 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE CADA UM DOS ANALITOS. MÉTODO CROMATOGRÁFICO 2 E MONITORAMENTO EM 200 nm..	83
FIGURA 20 -	CURVAS ANALÍTICAS (n=3) OBTIDAS POR MATRIX MATCHED EM ÁGUA ULTRAPURA (CÍRCULOS VERMELHOS) E NA NASCENTE (QUADRADOS PRETOS). A) DIA; B) DEA; C) ATZ; D) DIU; E)TFB.....	84
FIGURA 21 -	CURVAS ANALÍTICAS (n=3) OBTIDAS POR MATRIX MATCHED EM ÁGUA ULTRAPURA (CÍRCULOS VERMELHOS) E NO RIO IAPÓ (QUADRADOS PRETOS). A) DIA; B) DEA ; C) ATZ; D) DIU; E)TFB.....	85
FIGURA 22 -	INTERPRETAÇÕES GEOMÉTRICAS PARA: A) DIA, B) DEA, C) ATZ, D) DIU E E) TFB DOS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DO PLANEJAMENTO 2 ³ . SETAS AZUIS E LARANJADAS INDICAM AS PRINCIPAIS TENDÊNCIAS OBSERVADAS NA VARIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ALGUMAS CLASSES DE MICROPOLUENTES.....	20
TABELA 2 -	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS ESPÉCIES DE INTERESSE.....	24
TABELA 3 -	RELAÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	43
TABELA 4 -	SOLVENTES EMPREGADOS NOS ENSAIOS PRELIMINARES E ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	45
TABELA 5 -	MATRIZ DOS FATORES EMPREGADOS PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.....	51
TABELA 6 -	FATORES E NÍVEIS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO 2 ³ PARA A RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EM ÁGUA.....	52
TABELA 7 -	FATORES E NÍVEIS DO SEGUNDO PLANEJAMENTO 2 ³ PARA A OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO HLLME.....	53
TABELA 8 -	PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDAS POR LC-DAD. CURVA ANALÍTICA PREPARADA NA FASE MÓVEL. MÉTODO 1.....	58
TABELA 9 -	PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDAS POR LC-DAD. CURVA ANALÍTICA PREPARADA NA FASE MÓVEL. MÉTODO 2.....	60
TABELA 10 -	CONDIÇÕES ENSAIADAS NA PRIMEIRA MODELAGEM DE MISTURA. MASSA TOTAL 1,5 g.....	64
TABELA 11 -	RECUPERAÇÕES (%) OBTIDAS PARA OS ANALITOS NA PRIMEIRA MODELAGEM DE MISTURA. O ENSAIO 15 FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.....	66
TABELA 12 -	CONDIÇÕES ENSAIADAS NA MODELAGEM 2. MASSA TOTAL 1,5 g.....	67
TABELA 13 -	RECUPERAÇÕES (%) OBTIDAS PARA OS ANALITOS NA	

	SEGUNDA MODELAGEM DE MISTURA. O ENSAIO 10 FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.....	68
TABELA 14 -	ANOVA PARA OS MODELOS QUADRÁTICOS OBTIDOS PARA DIA, DEA, ATZ E DIU POR MODELAGEM DE MISTURA. MODELAGEM 2 COM RESTRIÇÕES.....	70
TABELA 15 -	CONDIÇÕES EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE SOLVENTE.....	75
TABELA 16 -	RESULTADOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA (INTER-DAY), REPETIBILIDADE (INTRA-DAY) E EXATIDÃO (RECUPERAÇÃO ABSOLUTA) PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO DLLME-LC-DAD COLETA 1 (AGOSTO DE 2016).....	77
TABELA 17 -	PARÂMETROS OBTIDOS PELAS ANOVAs DE FATOR ÚNICO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NOS DIFERENTES PONTOS DE COLETA. COLETA 1 (AGOSTO DE 2016).....	78
TABELA 18 -	EFEITOS OBTIDOS PARA OS SETE PARÂMETROS AVALIADOS PELO TESTE DE YOUTDEN.....	79
TABELA 19 -	RECUPERAÇÃO PARA OS ANALITOS NA SEGUNDA COLETA (JUNHO DE 2017).....	81
TABELA 20 -	PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS POR SUPERPOSIÇÃO DE MATRIZ DLLME-LC-DAD.....	86
TABELA 21 -	PRINCIPAIS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO DLLME-LC-DAD PROPOSTO.....	86
TABELA 22 -	COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS MÉTODOS.....	88
TABELA 23 -	RESULTADOS OBTIDOS PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ AVALIANDO OS EFEITOS DO VOLUME DE CLOROFÓRMIO, DICLOROMETANO E ACETONITRILA NA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.....	89
TABELA 24 -	EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO PARA O	

	PRIMEIRO PLANEJAMENTO 2 ³ . OS VALORES EM NEGRITO SÃO SIGNIFICATIVOS COM 95 % DE CONFIANÇA.....	90
TABELA 25 -	RESULTADOS OBTIDOS PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ AVALIANDO OS EFEITOS DO VOLUME DE ACETONITRILA, VOLUME DE AMOSTRA E TEOR DE SULFATO DE MAGNÉSIO NA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.....	93
TABELA 26 -	EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO PARA O PLANEJAMENTO 2 ³ OTIMIZADO.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	–	Acetonitrila
ANOVA	–	Análise de variância
ATZ	–	Atrazina
CLO	–	Clorofórmio
CONAMA	–	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV	–	Coeficiente de variação
DAD	–	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arranjo de diodos)
DCM	–	Diclorometano
DEA	–	Desetilatrazina
DIA	–	Desisopropilatrazina
DIU	–	Diuron
DLLME	–	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> (Microextração líquido-líquido dispersiva)
EtOH	–	Etanol
FE	–	Fator de enriquecimento
GC	–	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia a Gás)
GC-FID	–	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i> (Cromatografia a Gás com detecção por ionização de chama)
GC-MS	–	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> (Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas)
HF-LPME	–	<i>Hollow fiber-based liquid phase microextraction</i> (Microextração em fase líquida com fibra oca)
HLLME	–	<i>Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction</i> (Microextração líquido-líquido homogênea)
IL	–	Ionic Liquid (Líquido iônico)
K_a	–	Constante de dissociação ácida
K_{ow}	–	Coeficiente de partição octanol - água
LC	–	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia a Líquido)
LC-DAD	–	Cromatografia a Líquido com detecção no ultravioleta por arranjo de diodos
LC-UV	–	Cromatografia a Líquido com detecção no ultravioleta

LLE	–	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extração líquido-líquido)
LOD	–	<i>Limit Of Detection</i> (Limite de Detecção)
LOQ	–	<i>Limit Of Quantification</i> (Limite de Quantificação)
LPME	–	<i>Liquid Phase Microextraction</i> (Microextração em fase líquida)
MeOH	–	Metanol
MM	–	Massa molar
MQ	–	Média quadrática
MR-IL	–	<i>Magnetic Retrieval of Ionic Liquid</i> (recuperação magnética de líquido iônico)
MS	–	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
QuEChERS	–	<i>Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe</i>
r	–	Coeficiente de Correlação
R	–	Resolução cromatográfica
S _{água}	–	Solubilidade em água
SBSE	–	<i>Stir Bar Sortive Extraction</i> (Extração em barra sortiva de agitação)
SFO	–	<i>Solidification of Floating Organic Drop</i> (<i>Solidificação da gota única</i>)
SPE	–	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
SPME	–	<i>Solid Phase Microextraction</i> (Microextração em fase sólida)
SQ	–	Soma quadrática
TFB	–	Teflubenzuron
TOL	–	Tolueno
USA	–	Ultrasound Assisted (<i>Assistida por ultrasom</i>)
VA	–	Vortex Assisted (<i>Assistida por vortex</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. MICROPOLUENTES DE RELEVÂNCIA.....	20
2.2. PESTICIDAS NO AMBIENTE.....	21
2.3. DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO.....	27
2.4. EXTRAÇÃO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS AQUOSAS AMBIENTAIS.	28
2.4.1. Microextração líquido-líquido homogênea (HLLME).....	29
2.4.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	33
2.5. MODELAGEM DE MISTURAS.....	36
3. OBJETIVOS.....	42
3.1.OBJETIVO GERAL.....	42
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. EQUIPAMENTOS E INSUMOS.....	43
4.2. MÉTODOS.....	44
4.2.1. Preparo das soluções estoque	44
4.2.2. Análise cromatográfica e curvas analíticas.....	44
4.2.3. Microextração líquido-líquido dispersiva	45
4.2.3.1. Avaliação do solvente extrator e dispersor.....	45
4.2.3.2. Análise de amostras reais.....	47
4.2.3.3. Validação do método DLLME-LC-DAD.....	49
4.2.4. Superposição de matriz (" <i>matrix-matched</i> ").....	52
4.2.5. Microextração líquido-líquido homogênea (HLLME).....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1. OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	54
5.2. CURVAS ANALÍTICAS.....	56
5.3. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DLLME.....	60
5.3.1. Avaliação dos solventes extrator e dispersor.....	60
5.3.2. Solvente de reconstituição.....	62
5.3.3. Modelagem de mistura CLO:DCM:ACN.....	63

5.3.3.1. Modelagem 1.....	64
5.3.3.2. Modelagem 2.....	66
5.3.3.3. Avaliação da quantidade de solvente empregada.....	74
5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DLLME-LC-DAD E ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS.....	76
5.5. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA HLLME.....	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	95
7. REFERÊNCIAS.....	96

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a química analítica instrumental evoluiu de forma admirável, disponibilizando ferramentas para a determinação de inúmeras espécies de relevância em concentrações da ordem de traços e ultra-traços. Neste contexto é possível destacar as técnicas cromatográficas associadas a detectores de massa, técnicas hifenadas de reconhecida importância, e que não raramente permitem a detecção de até fentogramas.

Embora a seletividade e a sensibilidade destas técnicas sejam dignas de destaque, habitualmente o estabelecimento de métodos de análise requer o uso de procedimentos de preparo de amostra, orientados a pré-concentrar os analitos e separá-los de possíveis componentes da matriz (*clean-up*) que possam interferir na análise. Com este propósito, técnicas de extração em fase líquida e sólida têm sido propostas desde o século XIX, o que faz com que atualmente exista uma grande variedade de alternativas analíticas, aplicáveis à análise de amostras complexas. Neste contexto, esforços têm sido realizados para disponibilizar sistemas de extração em micro-escala, objetivando principalmente, diminuir o consumo de solventes.

Dentro do contexto dos sistemas de extração por solventes, destaque deve ser dado a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês: *dispersive liquid-liquid microextraction*), técnica que tem possibilitado inúmeras determinações de poluentes de relevância em matrizes ambientais.

Recentemente, grande atenção tem sido dedicada à determinação de micropoluentes orgânicos em matrizes ambientais e alimentos, principalmente devido à constatação de efeitos adversos aos ecossistemas e à saúde humana, mesmo em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Dentre estes poluentes é possível destacar fármacos, hormônios e pesticidas.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar sistemas de extração em fase líquida para a determinação de pesticidas em amostras de águas naturais. Os sistemas de extração são fundamentados na técnica DLLME, introduzindo modificações para operar na forma de sistemas homogêneos de extração. Os pesticidas selecionados correspondem a diuron (herbicida do grupo fenil-uréia), teflubenzuron (inseticida do grupo benzoiluréia), atrazina (herbicida do grupo das

triazinas) e dois de seus metabólitos: desisopropil-atrazina e desetil-atrazina, espécies de ocorrência relatada em águas naturais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICROPOLUENTES DE RELEVÂNCIA

O crescimento populacional e a consequente ampliação das atividades industriais e agropecuárias promoveram nas últimas décadas um aumento exacerbado da poluição ambiental, especialmente dos recursos hídricos, uma vez que a água é o principal dispersor de resíduos associados ao despejo de esgotos urbanos e industriais. Assim, a regulamentação de substâncias potencialmente tóxicas ao meio ambiente e à saúde tem sido uma preocupação das agências ambientais de diversos países (EU, 1998; BRASIL, 2005).

Neste contexto, destaca-se o monitoramento de poluentes orgânicos em baixas concentrações, usualmente na faixa de mg L^{-1} a ng L^{-1} (HILTON e THOMAS, 2003), nas mais diversas matrizes, incluindo alimentos (PARA, 2013) e amostras ambientais, como águas naturais, efluentes, solos e atmosfera (SILVA e COLLINS, 2011). Esses contaminantes são, de maneira geral, compostos de uso cotidiano, tais como, aditivos industriais, defensivos agrícolas, hormônios esteróides e produtos farmacêuticos (GAFFNEYA *et al.*, 2014), dentre outras classes exemplificadas na Tabela 1.

TABELA 1: ALGUMAS CLASSES DE MICROPOLUENTES.

Classe	Exemplos
Produtos farmacêuticos	
Antibióticos	Sulfametazona, trimetoprima, eritromicina
Analgésicos e anti-inflamatórios	Ácido acetilsalicílico, codeína, ibuprofeno, diclofenaco
Drogas de uso psiquiátrico	Diazepam, fluoxetina, carbamazepina, haloperidol
Reguladores lipídicos	Ácido clofíbrico, benzafibrato, gemfibrozil
β -bloqueadores	Metoprolol, atenolol, timolol
Estimulantes	Cafeína
Esteróides e hormônios	
	Estrona, 17- β -estradiol, estriol, dietilestilbestrol
Agrotóxicos	
	Atrazina, carbendazin, glifosato, diuron, teflubenzuron
Produtos de higiene pessoal	
Fragrâncias	Nitropolicíclicos, macrocíclicos
Protetores solares	Cânfora metilbenzilideno, benzofenona
Antissépticos	Triclosan, clorofeno
Retardantes de chama	
	Difeniléteres polibromados (PBDEs), bisfenol A
Aditivos industriais	
	EDTA, sulfonados aromáticos

Fonte: (SILVA & COLLINS, 2011; BILA e DEZOTTI, 2007; MOMPÉLAT, LE BOT e THOMAS, 2009; STUART *et al.*, 2012; RODIL *et al.*, 2009; CARBO *et al.*, 2008).

Dentro do numeroso grupo de poluentes de relevância destacam-se os pesticidas, que são extensivamente utilizados na agricultura para o controle de pragas. De maneira geral, estas espécies apresentam elevada toxicidade e persistência no meio ambiente (KOIFMAN e HATAGIMA 2003), o que justifica os esforços dedicados ao estabelecimento de rotinas que permitam a sua quantificação em matrizes de interesse.

2.2. PESTICIDAS NO AMBIENTE

Nas últimas décadas o consumo de pesticidas cresceu consideravelmente, devido à necessidade de promover o controle de pragas nas lavouras, visando suprir a crescente demanda de produtos agrícolas. Essas substâncias são classificadas de acordo com o seu emprego, sendo por exemplo os herbicidas utilizados na prevenção e combate de ervas daninhas, inseticidas no controle de insetos e fungicidas para o controle de fungos. Ainda são classificados em quatro classes, de acordo com o potencial de periculosidade ambiental (IBAMA, 1996), sendo os de classe I altamente perigosos, classe II muito perigosos, classe III perigosos e os de classe IV pouco perigosos ao meio ambiente.

Entre 2008 e 2013 o Brasil se destacou como maior consumidor mundial de agrotóxicos (PARA, 2013; ABRASCO, 2012). Em 2011, a indústria de defensivos agrícolas comercializou 1 bilhão de litros de produtos, o que corresponde a 5,2 litros por habitante. Em 2013 esse valor já havia aumentado para 7,3 litros por habitante (TYGEL, 2015).

Segundo o Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins divulgado pelo IBAMA (2013), entre 2009 e 2012 a atrazina e carbendazim permaneceram entre os dez ingredientes ativos mais comercializados no país, enquanto o diuron esteve entre os dez primeiros nos anos de 2010 e 2012. Ainda segundo o relatório do IBAMA, em 2012 o estado do Paraná consumiu 55.113,12 toneladas de pesticidas, das quais 290 ton correspondiam a ativos de classe I. A elevada comercialização fez com que o Paraná assumisse a terceira posição no mercado de agrotóxicos do país entre 2010 e 2012. A atrazina contribui significativamente para este consumo, e se consagrou entre os dez ativos mais vendidos no Paraná entre 2013 e 2014. O Teflubenzuron também se destaca, sendo o 5º ativo mais comercializado no estado em 2014 (SIAGRO).

Dentre as diferentes classes de pesticidas comercializadas no Brasil, os herbicidas foram os mais utilizados entre os anos de 2009 e 2012, seguidos pelos fungicidas e inseticidas (IBAMA, 2013). Isso se reflete na agricultura paranaense, sendo que em 2015 estas três classes corresponderam a 80,49 % dos ativos comercializados no estado (SIAGRO).

O elevado consumo associado à aplicação de excessos desnecessários na produção, ao uso indevido em culturas não autorizadas, bem como, à destinação final inadequada dos resíduos de lavagem das embalagens, podem levar a diversas consequências para o meio ambiente. Dentre elas é possível destacar o descontrole populacional de insetos polinizadores, o aumento da resistência de pragas, o surgimento de pragas secundárias devido à destruição de agentes naturais de controle biológico, bem como, à bioacumulação (VALICENTE, VIANA e MENDES, 2013).

O uso excessivo e o descarte inadequado podem ainda levar à contaminação do solo e dos recursos hídricos o que, de maneira geral, é evidenciado com maior frequência nas regiões de cultivo e em períodos próximos ao de aplicação. Contudo, esses defensivos podem ser transportados por grandes distâncias por meio de diferentes mecanismos, com destaque para a precipitação de moléculas volatilizadas através de água de chuva, o carreamento pelo vento durante a pulverização dos ativos nas plantações, o deslocamento pelo escoamento de águas superficiais, além da possibilidade de lixiviação até águas subterrâneas. Como consequência, podem atingir organismos não-alvo, bem como, serem disponibilizados para o consumo humano, uma vez que, de modo geral, os processos de tratamento de água não tem como foco a remoção desses poluentes (BILA e DEZOTTI, 2007).

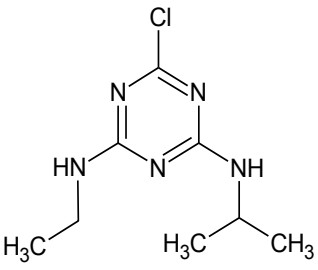
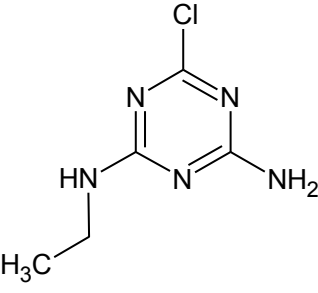
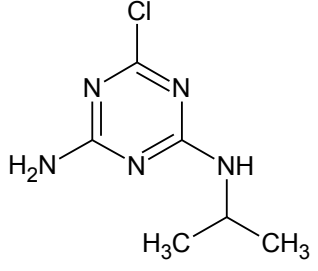
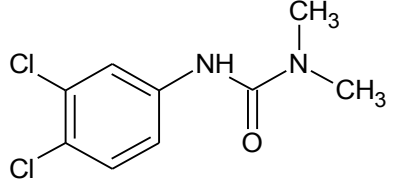
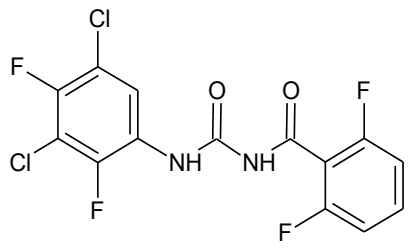
Nesse contexto, a contaminação de águas superficiais e de consumo já vem sendo relatada em diversos estados brasileiros, especialmente em regiões de elevada produção agrícola (ROCHA *et al.* 2015; MOREIRA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2016). A análise de água da chuva nos municípios de Lucas do Rio Verde e Campo Verde no Mato Grosso (MOREIRA *et al.*, 2012), por exemplo, evidenciou a contaminação por atrazina, tanto em amostras coletadas no campo quanto nas coletadas em regiões urbanas, evidenciando o transporte pelo vento de pesticidas volatilizados.

Apesar dos efeitos da exposição a baixas concentrações de pesticidas ainda serem alvos de investigação, esses ativos se enquadram na classe das substâncias desreguladoras endócrinas, que podem atuar mimetizando hormônios naturais, estimulando ou inibindo seus efeitos nos organismos, sendo que a exposição contínua pode estar associada ao diagnóstico de câncer e infertilidade (KOIFMAN e HATAGIMA 2003). Alguns pesticidas podem ainda levar a distúrbios neurológicos e psiquiátricos (ARAÚJO *et al.*, 2007), além de abortos espontâneos e malformações congênitas (ROJAS *et al.*, 2000).

Em função destes antecedentes, a Resolução CONAMA n. 357/2005 (BRASIL, 2005) e a Portaria do Ministério da Saúde 2914/2011 (BRASIL, 2011) regulamentam os limites de pesticidas em águas no Brasil. De acordo com estas resoluções o teor máximo permitido para atrazina em águas para o consumo é de $2 \mu\text{g L}^{-1}$, e de $90 \mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron. Contudo nem todos os pesticidas de uso liberado são contemplados pelos órgãos competentes, ao mesmo tempo em que o monitoramento de águas naturais e de consumo ainda é bastante escasso. Quando não há limites estabelecidos pela legislação brasileira utilizam-se os parâmetros definidos pela União Européia (EU, 1998), que estabelece o máximo de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para pesticidas individuais e de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para a quantidade total de pesticidas em águas para o consumo (CARBO *et al.*, 2008; DELLAMATRICE e MONTEIRO, 2014).

Portanto, é evidente a necessidade de monitorar pesticidas no ambiente, sendo essencial o desenvolvimento de metodologias que permitam quantificar baixas concentrações em matrizes de relevância ambiental. Assim, ênfase especial será dada aos pesticidas diuron (DIU), teflubenzuron (TFB) e atrazina (ATZ), bem como, dois de seus metabólitos desetil-atrazina (DEA) e desisopropil-atrazina (DIA). Algumas propriedades físico-químicas dos analitos estão descritas a seguir e listadas na Tabela 2.

TABELA 2: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS ESPÉCIES DE INTERESSE.

Ativo	Estrutura	MM (g mol ⁻¹)	pK _a (25°C)	log K _{ow}	S _{água} (mg L ⁻¹)	DT50 solo (dias)
ATZ		215,68	1,7	2,7	35	75
DIA		173,60	1,30- 1,58	1,13	670	-
DEA		187,68	1,30- 1,65	1,52	3200	-
DIU		233,09	-	2,87	35,6	89
TFB		381,11	9,2	4,56	0,02	92

Fonte: (PPDB; MELLO, LOBO e YABE, 2009; YOON *et al.*, 2012; MILHOME *et al.*, 2009; LOOS e NIESSNER, 1999; PACÁKOVÁ *et al.*, 1996; FAO/WHO, 2016).

A atrazina, 2-cloro-4etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, é um herbicida triazínico de uso pré e pós-emergência, empregado em culturas como as da cana-de-açúcar e do milho (ANVISA, 2009). É absorvida nas raízes se translocando até as folhas, ou diretamente nas folhas (pós-emergência), inibindo a fotossíntese e levando à morte das ervas daninhas (COUTINHO *et al.*, 2005).

A exposição humana à ATZ pode levar a distúrbios neurológicos e reprodutivos como a redução da qualidade do sêmen (ABASS *et al.*, 2012; CARMO *et al.*, 2013; HASE *et al.*, 2008), desregulação no ciclo menstrual (CRAGIN *et al.*, 2011), anomalias pré-natais, abortos espontâneos, e ainda apresenta possível associação com o câncer de mama (SIMPKINS *et al.*, 2011).

Outro problema associado com a presença de pesticidas no ambiente está relacionado a ação microbiológica que pode ocasionar a degradação do mesmo, gerando produtos com toxicidade comparável e até mesmo superior a de seu precursor. A ATZ pode sofrer degradação via processos bióticos e abióticos, sendo que a dealquilação microbiológica, por exemplo, leva à formação de dois de seus metabólitos: DIA e DEA (BARCELÓ e HENNION, 1997). Esses compostos possuem menor $\log K_{ow}$, apresentando assim maior polaridade e solubilidade em água (Tabela 2), o que torna a contaminação de águas naturais ainda mais preocupante.

Milhome *et al.* (2009) avaliaram o potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas na região do Baixo Jaguaribe-CE, levando em conta suas propriedades físico-químicas. Segundo o estudo, a ATZ foi classificada com alto potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Assim, como consequência de suas propriedades, a ATZ é o contaminante detectado com maior frequência em águas subterrâneas segundo a Agência Ambiental do Reino Unido (STUART *et al.*, 2012), além de recorrente em ambientes aquáticos em níveis acima do estipulado pela União Européia, o que levou a proibição de seu uso em diversos países como Espanha, Alemanha e Itália (DEB, 2006).

O diuron, 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia, é um herbicida do grupo feniluréia utilizado em culturas como abacaxi, algodão, banana, café, cana-de-açúcar e uva (ANVISA, 2009). Apresenta propriedades físico-químicas semelhantes à ATZ, como $\log K_{ow}$ inferior a 3 e moderada solubilidade em água. Estas propriedades elevam a possibilidade de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, de modo que, assim como a atrazina, o diuron é classificado como perigoso ao meio

ambiente, classe III (ANVISA, 2009). Um estudo desenvolvido na Unesp confirmou o potencial cancerígeno da exposição ao diuron em ratos, revelando aumento na incidência em câncer na bexiga, mesmo em doses cinco vezes menores do que as consideradas nocivas até então (CATALANO *et al.*, 2014). Ainda, a exposição ao diuron já foi associada a alterações de comportamento em peixes dourados (SAGLIO e TRIJASSE, 2004), bem como, à ocorrência de deformações no crescimento de embriões de sapos (SCHUYTEMA e NEBEKER, 2004; FURTADO *et al.*, 2007).

O teflubenzuron, 1-(3,5-dicloro-2,4-difluorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)uréia, é um inseticida do grupo benzoiluréia empregado no controle de artrópodes e crustáceos, com ação na biossíntese de quitina. Seu modo de atuação já é um grande indício da toxicidade aos organismos invertebrados aquáticos não-alvo (SEPA, 1999). É um inseticida de aplicação foliar em culturas de algodão, aveia, batata, café, cevada, cana-de-açúcar, citros, fumo, girassol, milho, soja, sorgo, tomate e trigo (ANVISA, 2009), sendo ainda utilizado no controle de parasitas em produções de peixes.

Apesar ser considerado pouco tóxico ao meio ambiente, classe IV, (ANVISA, 2009), segundo Ikefuti (2012) o emprego de TFB no controle parasitário de peixes pode levar a alterações tóxicas transitórias em brânquias, fígado e rins, apesar de não ter sido observado efeitos em ensaios agudos. A bioacumulação do TFB em peixes também pode apresentar risco ao consumidor, logo devem ser respeitadas as dosagens estabelecidas pelos fabricantes e o período de carência da comercialização.

Ainda de acordo com Milhome *et al.* (2009) o TFB, que apresenta baixa solubilidade em água, bem como, $\log K_{ow}$ superior a 3, foi classificado como um pesticida de elevado potencial de contaminação do solo, sendo a lixiviação desfavorecida, o que implica em baixa capacidade de contaminação de águas subterrâneas. O TFB apresentou potencial de contaminação médio para águas superficiais e já foi detectado em áreas de cultivo de algodão no município de Primavera do Leste (MT) na concentração de $2,62 \mu\text{g L}^{-1}$ em uma das fazendas avaliadas. No mesmo estudo foi detectado $0,78 \mu\text{g L}^{-1}$ de diuron (CARBO *et al.*; 2008).

2.3. DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

A cromatografia é uma importante técnica de separação de misturas, sendo vastamente empregada na indústria e em laboratórios de análise e de pesquisa, e vem se mostrando uma essencial ferramenta para análises ambientais. Atualmente, com os avanços tecnológicos, é possível determinar uma gama de substâncias em um curto intervalo de tempo, seja por cromatografia a gás (GC, do inglês “*Gas Chromatography*”) ou a líquido (LC, do inglês: *Liquid Chromatography*), com elevada resolução, eficiência e sensibilidade.

Em se tratando de análises ambientais via cromatografia, a detecção por espectrometria de massas merece destaque e vem sendo vastamente empregada para este fim, uma vez que, além de garantir apropriada análise qualitativa, permite alcançar limites de quantificação (LOQ) muito baixos, não raramente na ordem de ng L^{-1} (SILVA e COLLINS, 2011). Contudo, apesar de muito eficaz para a análise simultânea, este sistema de detecção apresenta elevado custo de aquisição e manutenção, de modo que o monitoramento de compostos orgânicos por LC com detecção por ultravioleta (UV) se apresenta como uma alternativa menos dispendiosa e com sensibilidade adequada para análises ambientais, permitindo atingir muitas vezes limites de detecção (LOD) na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (SILVA e COLLINS, 2011). Além disso, detectores UV por arranjo de diodos (DAD, do inglês “*Diode Array Detector*”) possibilitam o monitoramento simultâneo de diferentes comprimentos de onda, além de permitirem verificar a pureza das bandas de eluição pela comparação espectral com uma biblioteca, ou mesmo com o espectro de padrões, fornecendo maior qualidade aos resultados das análises.

Diversos estudos relatam métodos para determinação simultânea de pesticidas via cromatografia a líquido de fase reversa, essencialmente fundamentados no uso de colunas de sílica C18 e diversos métodos de detecção. As fases móveis mais utilizadas são sistemas metanol:água ou acetonitrila:água, com ajuste da força cromatográfica até obtenção da separação adequada das bandas de eluição. A adição de modificadores e tampões permite o ajuste do pH do meio, favorecendo a existência de uma única espécie do analito, preferencialmente não ionizada, e melhorando suas interações com a fase móvel e a fase estacionária (SILVA e COLLINS, 2011).

Carbo *et al.* (2008), por exemplo, desenvolveram um método LC-DAD para a determinação simultânea de oito pesticidas em águas subterrâneas de plantações de algodão no MT, incluindo diuron e teflubenzuron. Foi empregada uma coluna C18 Omnisphere (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) e eluição por gradiente de acetonitrila:água, com injeção de 10 µL, sob vazão de 1,0 mL min⁻¹, e monitoramento em 230 nm. Nestas condições foi obtida adequada separação cromatográfica entre diuron e teflubenzuron e tempos de retenção (t_R) de 21,72 min e 36,28 min respectivamente.

Na metodologia LC-DAD estabelecida pelo departamento de alimentos e agricultura da Califórnia (CALIFORNIA DEPT. OF FOOD & AGRICULTURE, 1998) foi utilizada uma coluna Ultrasphere C18 (50 mm x 4,5 mm, 5 µm) e eluição isocrática de acetonitrila:água (40:60 v:v) para a determinação de atrazina e diuron, obtendo-se t_R de 10,30 min e 11,20 min, respectivamente. Métodos similares foram propostos por Yoon *et al.* (2012) e AMARAL *et al.* (2014) para a determinação de TFB e ATZ/DIA/DEA, respectivamente, tendo sido obtidos resultados similares.

Embora a seletividade e a sensibilidade das técnicas cromatográficas sejam dignas de destaque, a baixa concentração dos analitos e a complexidade das matrizes ambientais faz com que o preparo de amostra precedendo a análise cromatográfica seja cada vez mais frequente no monitoramento de micropoluentes.

2.4. EXTRAÇÃO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS AQUOSAS AMBIENTAIS

De maneira geral, a determinação de micropoluentes em matrizes de relevância ambiental exige o emprego de métodos de preparo de amostra, que garantam tanto a remoção de interferentes (*clean-up*) quanto a pré-concentração e o isolamento do analito da matriz (MADUREIRA *et al.*, 2010).

Atualmente, diversas técnicas vêm sendo empregadas para este fim (CALDAS *et al.*, 2011), e importante destaque deve ser dado a extração em fase sólida (SPE, do inglês “*Solid Phase Extraction*”) (BOULANOUAR *et al.*, 2018; CAO *et al.*, 2017), em que os analitos são retidos por uma fase sólida sorvente e posteriormente eluídos com solvente adequado. A microextração em fase sólida (SPME, do inglês “*Solid Phase Microextraction*”) (BOUSSAHEL *et al.*, 2002; BONANSEA, AMÉ e WUNDERLIN *et al.*, 2013) é uma técnica livre de solventes, que consiste na sorção dos analitos em uma fibra de sílica modificada e posterior dessorção diretamente no injetor da cromatografia a gás ou solubilização na fase móvel para análise por LC. Já

a extração sortiva em barra magnética (SBSE, do inglês “*Stir Bar Sorptive Extraction*”) (MARGOUN *et al.*, 2013; ASSOUMANI *et al.*, 2014), é baseada no mesmo princípio da SPME, e um material sortivo recobre uma barra magnética.

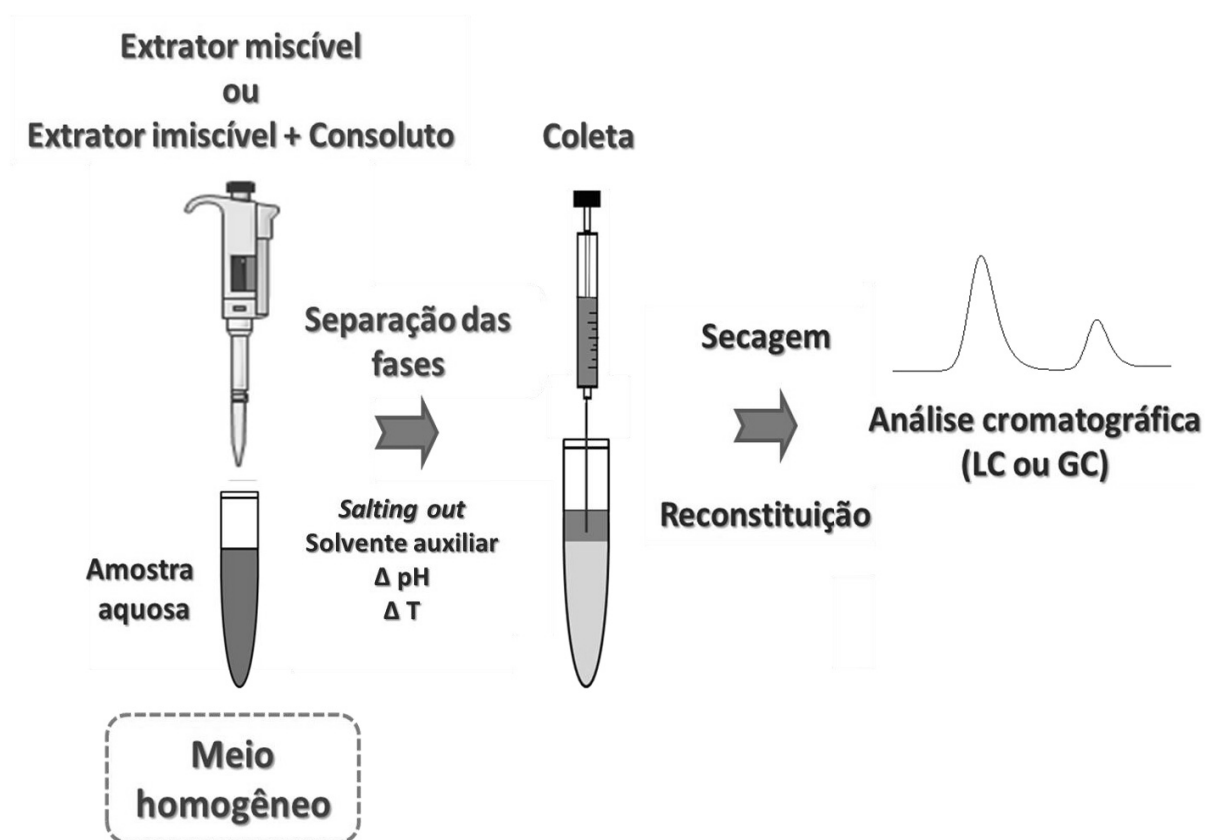
No contexto dos sistemas de extração em fase líquida é possível destacar a extração líquido-líquido (LLE, do inglês “*Liquid-Liquid Extraction*”), técnica que consiste, de maneira geral, na extração de um soluto de uma fase líquida (aquosa) por outra fase líquida imiscível (orgânica) capaz de interagir com o soluto, sendo o processo regido pelo coeficiente de partição do analito entre as duas fases. A LLE apresenta baixa seletividade, emprega grandes volumes de solventes orgânicos (o que pode limitar o fator de pré-concentração) e ainda apresenta certa dificuldade na separação das fases, especialmente em sistemas em que são geradas emulsões. Em função disto, nos últimos anos houve um grande interesse em estabelecer rotinas miniaturizadas e alternativas à LLE, como a microextração em fase líquida (LPME, do inglês “*Liquid Phase Microextraction*”) (PINTO *et al.*, 2010), a microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME, do inglês “*Hollow fiber-based liquid phase microextraction*”) (PAYÁN *et al.*, 2011), a microextração líquido-líquido homogênea (HLLME, do inglês “*Homogeneous Liquid-Liquid Microextraction*”) (HOSSEINIA *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2015; TORBATI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016) e a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês “*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*”) (MARTINS *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2011; NAGAJARU e HUANG, 2007; CHOU, LIN e FUH, 2009; PRIMEL *et al.*, 2017). Dentre as qualidades almejadas pelos novos métodos pode-se citar rapidez, seletividade, elevada recuperação absoluta, aplicação em diferentes classes de substâncias e mínimo consumo de solventes tóxicos (CALDAS *et al.*, 2011).

2.4.1. Microextração líquido-líquido homogênea (HLLME)

Na HLLME (Figura 1) a extração do soluto se dá a partir de uma solução homogênea. Nesta técnica o solvente extrator pode ser completamente miscível em água (metanol, etanol, acetonitrila, acetona) ou composto por uma mistura de um solvente imiscível que é solubilizado na fase aquosa por um solvente miscível (consoluto) (FACCHIN e PASQUINI, 1998), de modo a se obter uma solução homogênea. Assim o contato do/dos solvente(s) com o soluto é largamente favorecido, sem que seja necessária agitação vigorosa para que a extração ocorra.

A separação de fases é induzida por variações que dependem da natureza do sistema, podendo ser a redução da temperatura após uma extração à quente, a alteração do pH, a adição de um solvente auxiliar ou a saturação do meio aquoso com um sal solúvel (*salting out*), de modo a reduzir a miscibilidade entre as fases orgânica e aquosa (ANTHEMIDIS e IOANNOU, 2009). A fase extratora pode então ser recuperada para análise quantitativa, geralmente via cromatografia.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO HOMOGÊNEA (HLLME).



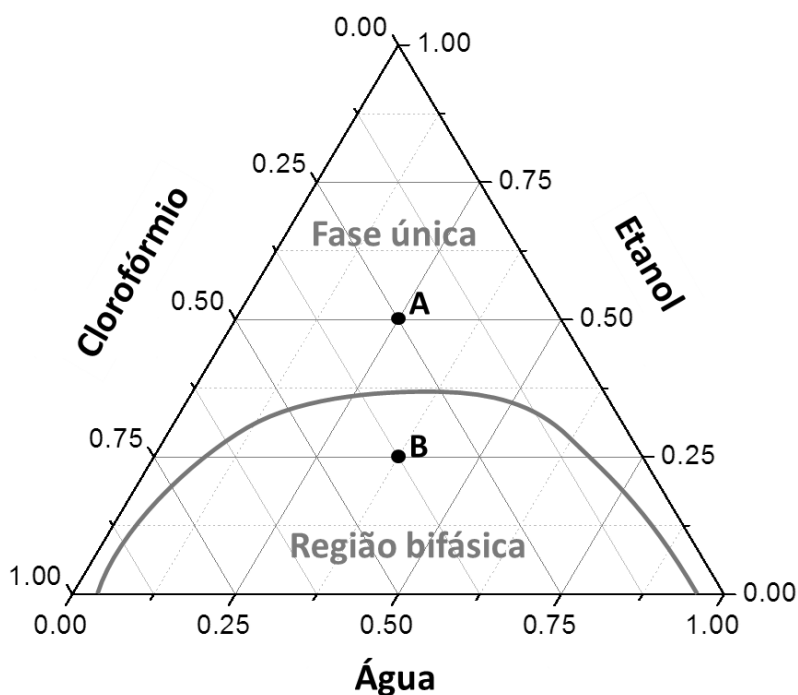
FONTE: ADAPTADO DE SERVIER MEDICAL ART.

Ao se empregar um solvente que apresenta alta solubilidade na amostra apenas em determinadas temperaturas, é possível obter a separação das fases por meio do resfriamento do sistema após a extração. Murata *et al.* (1972), por exemplo, empregaram o carbonato de propileno, cuja solubilidade em água aumenta exponencialmente com a temperatura, como solvente extrator para a determinação de íons ferro III em amostras aquosas. As extrações foram realizadas à 80 °C, e a

recuperação do extrato foi efetuada por centrifugação após as amostras atingirem a temperatura ambiente.

Já a adição de um solvente auxiliar pode quebrar a homogeneidade do sistema, ao deslocar a composição da mistura para uma condição heterogênea. Um sistema composto por água, etanol e clorofórmio pode ser quebrado à um sistema bifásico, por exemplo, pela adição de um excesso de água, o que deslocaria a composição da mistura do ponto A (50 % etanol, 25 % clorofórmio, 25 % água) para B (25 % etanol, 37,5 % clorofórmio, 37,5 % água), conforme a Figura 2.

FIGURA 2. DIAGRAMA DE FASES ETANOL-CLOROFÓRMIO-ÁGUA.



FONTE: ADAPTADO DE SERON, 1981.

Em um sistema homogêneo em que o clorofórmio foi miscibilizado na amostra aquosa pelo ácido acético, por exemplo, a separação pode ser promovida pela adição de uma base, como o hidróxido de sódio, que consome o ácido a acetato de sódio. Assim, o clorofórmio deixa de ser solvatado pelo consolut e como consequência acaba se separando do meio aquoso. Esse sistema foi empregado por Farajzadeh *et al.* (2009) para a determinação de íons cobre (II) em amostras de água.

O efeito *salting out* permite a redução da miscibilidade de compostos orgânicos em água devido ao aumento da força iônica do meio aquoso. Sais como o sulfato de magnésio e cloreto de sódio são eficazes na separação de acetonitrila da água, por exemplo, sendo empregados em sistemas homogêneos como ocorre na primeira etapa da técnica *QuEChERS* (acrônimo do inglês: **Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe**) (PRESTES *et al.*, 2009) para a análise de amostras aquosas. Esse tipo de separação permite o uso de solventes miscíveis em água, que apresentam boas características extratoras, tal como elevadas constantes dielétricas e número de doadores, o que não era praticável na LLE convencional (ANTHEMIDIS e IOANNOU, 2009).

A HLLME é uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que vem sendo vastamente empregada para a extração de íons metálicos em amostras aquosas, garantindo boas recuperações mesmo em concentrações traço (ANTHEMIDIS e IOANNOU, 2009). Essas características são extremamente desejáveis para a determinação de analitos orgânicos, contudo o emprego para este fim ainda é bastante escasso.

Hosseinia *et al.* (2013), determinaram quatro hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água via HLLME-GC-FID (cromatografia a gás com detecção por ionização de chama, do inglês: *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*). Foram empregados 50 μL de tolueno e 2,5 mL de metanol como extratores a 22 mL de amostra aquosa contendo $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, em uma cela especialmente desenvolvida para facilitar a coleta da fase orgânica sobrenadante. Nestas condições foram obtidos limites de detecção entre 14 e $41 \mu\text{g L}^{-1}$.

Xu *et al.* (2015) empregaram HLLME-GC-MS (cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) para a determinação de pesticidas triazóis em água, por meio da adição de uma mistura homogênea de 3,0 mL de amostra com 650 μL de acetonitrila à 1,300 g de NaCl para promover a separação por *salting out* assistida por ultrassom. Na condição otimizada foram obtidos LOD entre 0,04 e $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ entre 1,3 e $48,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Com fatores de enriquecimento (FE) entre 120 e 190 vezes foram atingidas recuperações nas amostras reais entre 89,6 e 119%, com desvio padrão inferior a 8,1 %.

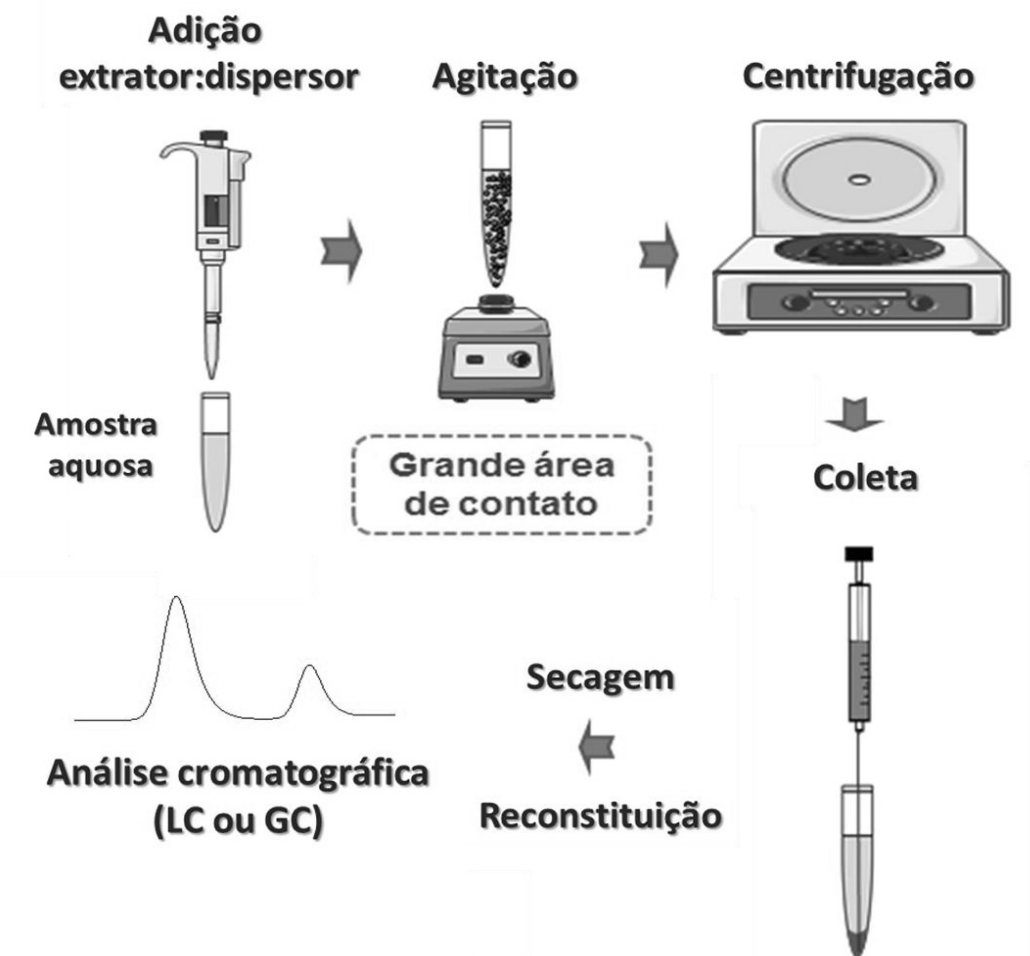
2.4.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME é uma técnica de pré-concentração baseada em um sistema ternário de componentes, bastante semelhante à HLLME. A diferença é que na HLLME produz-se uma mistura de fases homogênea e em seguida se adiciona um componente auxiliar que promova a separação das fases. Já em DLLME a separação das fases se dá pela rápida adição de uma mistura contendo o solvente extrator e um dispersor à amostra aquosa, de modo a gerar uma dispersão de gotículas do solvente, sem formar fase homogênea como ocorre em HLLME. A grande vantagem destas técnicas é a que a extração ocorre rapidamente devido à elevada área de contato da amostra com os solventes, o que garante o rápido estabelecimento do equilíbrio.

Esta técnica tem sido aplicada para a determinação de pesticidas em matrizes aquosas pois apresenta baixo custo, principalmente decorrente do baixo consumo de solventes orgânicos, rapidez na extração, facilidade de operação, elevadas taxas de recuperação e fatores de enriquecimento (FE). Além disso, é compatível com análises cromatográficas por LC e GC (MARTINS *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2011).

A DLLME envolve etapas bastante simples (Figura 3). Inicialmente adiciona-se, com o auxílio de uma seringa ou micropipeta, uma mistura contendo o solvente extrator, que deve ser imiscível em água (ex.: clorobenzeno, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno), e um dispersor miscível nas duas fases (ex.: metanol, etanol, acetonitrila, acetona e tetra-hidrofurano) à amostra aquosa (CALDAS *et al.*, 2011).

FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME).



FONTE: ADAPTADO DE *SERVIER MEDICAL ART*.

Com a agitação promovida pelo jato da seringa ou mesmo pelo uso de um vortex, o solvente extrator é disperso na fase aquosa, processo este facilitado pelo solvente dispersor que é miscível nas duas fases. Essa dispersão gera microgotas do solvente extrator, o que aumenta a área de contato com a amostra aquosa e garante a rápida extração dos analitos. A recuperação do extrato orgânico pode ser feita por centrifugação, que leva à sedimentação das microgotas, uma vez que, em geral, os solventes empregados são mais densos que a água. A fase sedimentada pode então ser analisada diretamente pela técnica adequada ou ainda evaporada e redissolvida em um solvente apropriado para a análise cromatográfica.

Para a otimização da DLLME é preciso levar em conta diversos parâmetros tais como: (a) tipo de solvente extrator, que de maneira geral deve ser imiscível e mais denso que a água, pouco volátil de modo a evitar perdas por evaporação

durante o processo, extrair os compostos de interesse e ainda apresentar bom comportamento cromatográfico; (b) tipo de solvente dispersor que além de apresentar baixa volatilidade, deve ser solúvel no solvente extrator e na fase aquosa; (c) volume de solvente deve ser minimizado, a fim de elevar o fator de enriquecimento, mas também garantir uma quantidade de fase sedimentada suficiente para análise; (d) tempo de extração, que é o intervalo entre a injeção da mistura extrator:dispersor e a centrifugação, geralmente bastante curto, sendo esta a grande vantagem da técnica; (e) força iônica, que deve ser elevada de modo a facilitar separação das fases; e (f) pH, cujo ajuste visa manter os analitos na forma neutra para que, assim, possam interagir com a fase orgânica extratora (MARTINS *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2011).

A DLLME, assim como a HLLME, vem sendo largamente empregada na pré-concentração de metais (ANTHEMIDIS e IOANNOU, 2009), contudo a aplicação para a extração de compostos orgânicos já é uma realidade. Nagaraju e Huang (2007) empregaram DLLME para a determinação de triazinas em matrizes aquosas, utilizando 12 μL de clorobenzeno como solvente extrator, 1,0 mL de acetona como solvente dispersor para cada 5,00 mL de amostra contendo NaCl. A metodologia permitiu tempos de extração bastante reduzidos (cerca de 3 minutos), boa recuperação para amostras reais (85,2-119,4 %), baixos desvios ($< 8,67\%$) e fator de enriquecimento de 150 vezes para atrazina. Ainda foram alcançados LOD entre 0,021 e 0,120 $\mu\text{g L}^{-1}$.

No estudo de Chou *et al.* (2009) foi utilizado diclorometano como solvente extrator (60 μL) e tetra-hidrofurano como dispersor (1,0 mL) para a extração de herbicidas do grupo feniluréia de amostras aquosas. As análises de sedimentos foram realizadas por LC-UV, observando-se FE entre 68 e 126, recuperações entre 91 e 104 % e LOQ entre 0,10 e 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Caldas, Costa e Primel (2010) validaram uma metodologia empregando DLLME-LC-MS para a determinação dos pesticidas carbofuran, clomazone e tebuconazole em água, utilizando tetracloreto de carbono (60 μL) como solvente extrator e acetonitrila (2,0 mL) como dispersante, obtendo boas recuperações (63-120 %), desvio padrão relativo entre 1,9% e 9,1%, e FE de 50 vezes, garantindo LOQ de 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Diversas modificações vêm sendo implementadas à DLLME (PRIMEL *et al.*, 2017) a exemplo da DLLME com líquidos iônicos (IL, do inglês “*Ionic Liquid*”)

(TRUJILLO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; GURE *et al.*, 2015) e com solidificação da gota única (SFO, do inglês “*Solidification of Floating Organic Drop*”) (MANSOUR e DANIELSON *et al.*, 2017). Além disso, alternativas para propiciar adequada dispersão das microgotas vêm sendo utilizadas como o emprego de vórtex (VA, do inglês “*Vortex Assisted*”) (HROUZKOVÁ, BRIŠOVÁ e SZARKA, 2016) ou ultrassom (US, do inglês “*Ultrasound Assisted*”) (DUARTE; DORES e VILLA, 2016,; DIL *et al.*, 2016).

Algumas modificações da técnica visam facilitar a extração simultânea de analitos com coeficientes de partição octanol/água (K_{ow}) bastante discrepantes. Wang *et al.* (2014) empregaram 100 μL de clorofórmio:undecanol (1:1) para a determinação de nicotina ($\log K_{ow}$ 1,17) e cotinina ($\log K_{ow}$ 0,07) em urina via DLLME com solidificação da gota flutuante, conseguindo melhorar a recuperação de cotinina, em comparação ao emprego isolado destes solventes. Foram alcançados LOD de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, com recuperações entre 72,0–105,0 % e desvios padrão relativo inferiores a 8,43 %.

Farajzadeh e Khoshmaram (2015) empregaram uma mistura ternária de solventes extratores composta por clorofórmio (404 μL), diclorometano (122 μL) e tetracloreto de carbono (44 μL), utilizando 2 mL de dimetilformamida como dispersor. Foi avaliada a migração de aditivos plásticos de diversas polaridades ($\log K_{ow}$ 1,6 - 6,6) das embalagens para seu conteúdo (água mineral, suco de limão, vinagre, iogurte e soda), sendo possível melhorar significativamente a extração dos analitos mais polares, atingindo recuperações que variaram de 20-90 %. Foram atingidos FE entre 980 e 4500, LOD entre 0,09 e 0,55 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ entre 0,03 e 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$. Neste estudo, a fim de investigar a melhor proporção entre os solventes extratores, foi empregada modelagem de mistura, via planejamento *Simplex Centroide*, um tipo de planejamento de experimentos que permite avaliar o efeito das diferentes composições de uma mistura na resposta de interesse.

2.5. MODELAGEM DE MISTURAS

Planejamentos experimentais são ferramentas úteis tanto para a determinação das variáveis que afetam o sistema de estudo, quanto para a otimização da/das resposta(s) de interesse. Além de permitirem investigar simultaneamente um grande número de variáveis, os planejamentos possibilitam muitas vezes estimar os efeitos

de interação entre elas, o que via de regra não pode ser acessado em otimizações univariadas. Ainda, o emprego de planejamentos experimentais garantem, muitas vezes, a otimização das condições de interesse com um reduzido número de ensaios, o que permite economizar tempo e reduzir custos.

A modelagem de misturas é um tipo de planejamento experimental em que as proporções entre os constituintes da mistura dependem uma das outras, sendo a soma dos componentes limitada a 100 % (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010). Este tipo de planejamento tem amplas aplicações na indústria, no preparo e análise de alimentos, bem como, na otimização de experimentos, especialmente no que diz respeito ao preparo de amostras (DORIVAL-GARCÍA *et al.*, 2016; FARAJZADEH e KHOSHMMARAM 2015, WANG *et al.* 2014; KIAROSTAMI, 2014).

Os resultados experimentais provenientes dos planejamentos podem ser avaliados estatisticamente, o que geralmente facilita a interpretação dos dados (CALADO e MONTGOMERY, 2003). A obtenção de modelos empíricos, por exemplo, permite avaliar a resposta como uma função matemática das variáveis investigadas. Assim é possível estimar a resposta para uma dada condição não experimentalmente realizada, desde que esta esteja contida nos limites inferiores e superiores de cada uma das variáveis do planejamento experimental. Estes modelos podem ser obtidos pelo método de mínimos quadrados, cuja significância estatística deve ser avaliada pela análise de variância (ANOVA).

Para misturas ternárias os modelos que descrevem a resposta em função da composição da mistura podem ser lineares (apenas os efeitos principais dos fatores são significativos), quadráticos (além dos efeitos principais levam em conta as interações entre dois componentes da mistura), e cúbicos (consideram também os efeitos terciários de interação). Para a construção destes modelos, as diferentes combinações da mistura são dispostas em um triângulo, sendo que os vértices correspondem aos componentes puros, os pontos nas arestas às misturas binárias e os pontos no interior do triângulo às misturas ternárias.

Após a realização do delineamento experimental, a resposta pode então ser correlacionada com as proporções da mistura. Considerando uma mistura ternária dos componentes genéricos x_1 , x_2 e x_3 , e levando em conta que a soma dos constituintes deve ser igual a 100 %, ou seja:

$$x_1 + x_2 + x_3 = 1 \quad (1)$$

Um modelo linear para este sistema pode ser descrito por quatro termos:

$$\hat{y} = b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (2)$$

sendo \hat{y} a resposta, e b_i o coeficiente linear associado ao componente i .

Como $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, o termo b_o pode ser substituído na Equação 2 por $b_o(x_1 + x_2 + x_3)$:

$$\hat{y} = b_o(x_1 + x_2 + x_3) + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (3)$$

agrupando os termos em x_i e substituindo o termo $(b_o + b_i)$ por b_i^* tem-se:

$$\hat{y} = (b_o + b_1)x_1 + (b_o + b_2)x_2 + (b_o + b_3)x_3 \quad (4)$$

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 \quad (5)$$

assim, por exemplo, ao realizar o experimento com $x_1 = 1, x_2 = 0, x_3 = 0$ é possível estimar o coeficiente b_1^* :

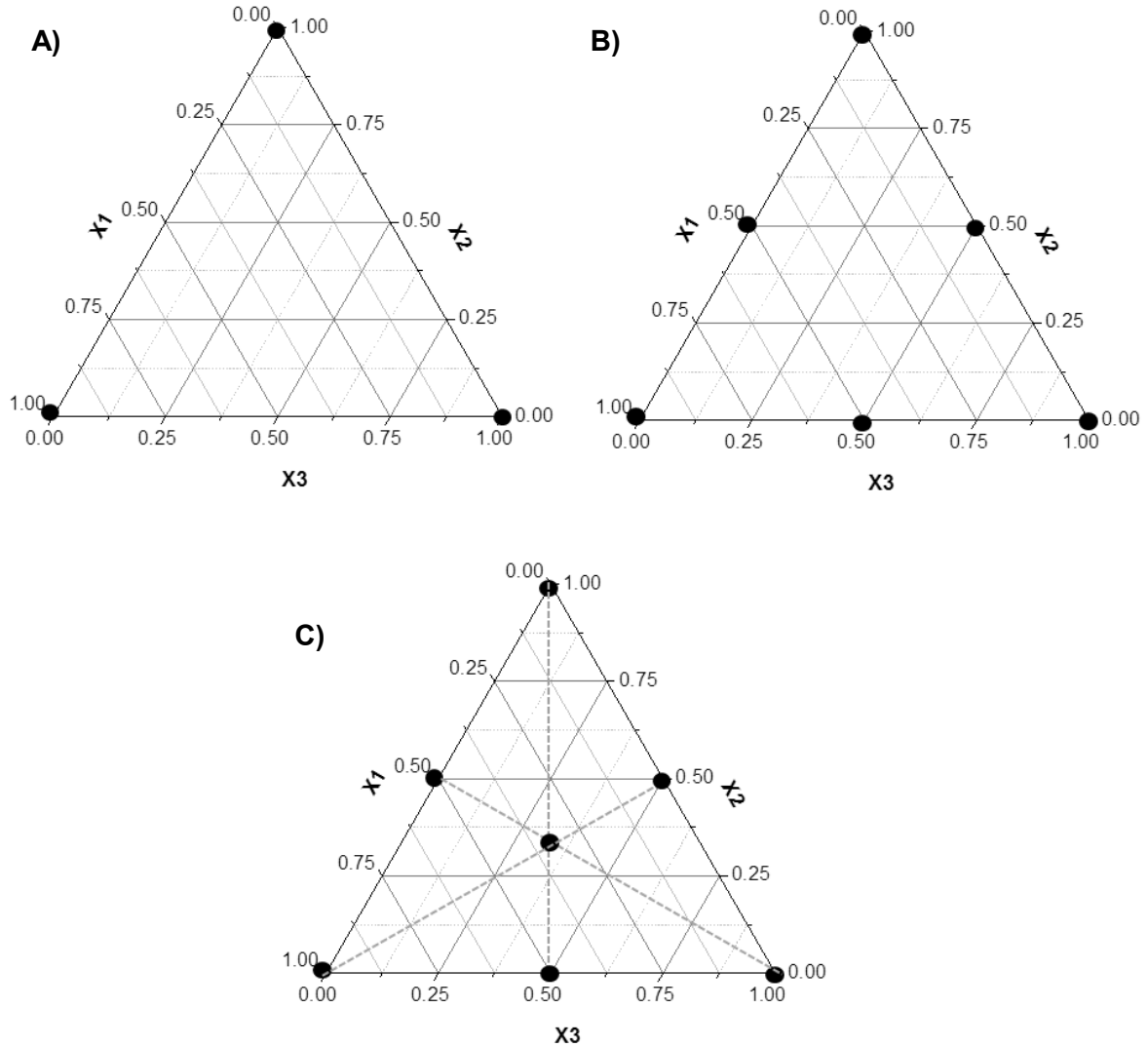
$$\hat{y} = b_1^* \times 1 + b_2^* \times 0 + b_3^* \times 0 \quad (6)$$

$$\hat{y} = b_1^* \quad (7)$$

Logo é possível determinar o modelo linear para uma mistura de três componentes com a realização de apenas três experimentos, empregando-se os

componentes puros, ou seja, nas condições (1,0,0), (0,1,0) e (0,0,1). Este tipo de delineamento experimental está exemplificado na Figura 4 A.

FIGURA 4. DIAGRAMAS TERNÁRIOS PARA OS PRINCIPAIS TIPOS DE MODELAGEM DE MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES. A) EXEMPLO GENÉRICO DE UMA MODELAGEM DE MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES. B) SIMPLEX LATTICE DESIGN. C) SIMPLEX CENTROID DESIGN.



Quando não é possível obter um modelo linear estatisticamente significativo pode-se avaliar o modelo quadrático, que é descrito como:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{33} x_3^2 \quad (8)$$

Aplicando uma dedução semelhante e novamente considerando a identidade $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, um simples rearranjo permite obter x_1 como função de x_2 e x_3 : $x_1 = 1 - x_2 - x_3$. Assim é possível substituir tanto $1 \times b_o = (x_1 + x_2 + x_3)b_o$ quanto $b_{11}x_1^2 = b_{11}x_1 x_1 = b_{11}x_1 (1 - x_2 - x_3)$ na equação 8. Fazendo o mesmo para $b_{22}x_2^2$ e $b_{33}x_3^2$, tem-se:

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_o(x_1 + x_2 + x_3) + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \\ & + b_{11}x_1(1 - x_2 - x_3) + b_{22}x_2(1 - x_1 - x_3) + b_{33}x_3(1 - x_1 - x_2) \end{aligned} \quad (9)$$

Agrupando devidamente os termos é possível descrever o modelo quadrático com apenas 6 termos:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 \quad (10)$$

sendo $b_i^* = b_o + b_i + b_{ii}$ e $b_{ij}^* = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$, em que $i \neq j$.

Assim, o modelo quadrático pode ser determinado com apenas seis experimentos: os mesmos três empregados para o modelo linear ((1,0,0), (0,1,0), (0,0,1)), mais três relativos às misturas binárias. Quando estes ensaios são realizados em proporções igualmente espaçadas, conforme a Figura 4 B, o planejamento é chamado de *Simplex Lattice*.

Arranjos e substituições semelhantes podem ser realizadas para o modelo cúbico (equação 11), obtendo-se o modelo cúbico especial (equação 12) (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010) que pode ser descrito com apenas um termo a mais que o modelo quadrático:

$$\hat{y} = b_o + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (11)$$

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 \quad (12)$$

Portanto, o modelo cúbico especial pode ser determinado com apenas sete experimentos, que podem ser os mesmo empregados para a obtenção do modelo quadrático, incluindo apenas mais uma mistura ternária para estimar o termo b_{123}^* . Quando esta mistura ternária é avaliada no ponto central do triângulo (1/3,1/3,1/3), conforme a Figura 4 C, o planejamento recebe o nome de *Simplex Centroid*.

Nem sempre é possível obter modelos empíricos válidos, o que é de grande interesse ao se otimizar múltiplas respostas, como ocorre, por exemplo, na análise simultânea de diferentes analitos. Isso pode ser alcançado, muitas vezes, com a realização de um maior número de experimentos de modo a garantir uma melhor estimativa dos coeficientes da equação. Além disso, é essencial que o delineamento experimental seja realizado em condições próximas a de melhor desempenho para o sistema (NETO, SCARMINIO e BRUNS 2010), e por este motivo, muitas vezes, é necessário efetuar uma modelagem com restrições, o que exige a introdução de pseudocomponentes para que as proporções entre os componentes da mistura continuem variando entre 0 e 100 %. Essa conversão facilita o planejamento experimental, simplifica o ajuste de modelos empíricos (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010) e pode ser realizada por meio da equação 13:

$$x_i^* = \frac{x_i - \text{limite inferior de } x_i}{1 - \sum \text{limites inferiores}} \quad (13)$$

sendo x_i a composição de i na mistura e x_i^* a respectiva pseudocomponente.

O emprego deste tipo de delineamento experimental pode propiciar uma boa abordagem para investigar as principais variáveis do método de extração por DLLME, especialmente ao se empregar mais de um solvente extrator, o que pode viabilizar a determinação de compostos com polaridades muito distintas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetiva avaliar sistemas de extração em fase líquida via DLLME e HLLME, para viabilizar a determinação de pesticidas modelo em amostras de águas naturais, por LC-DAD. Os pesticidas selecionados correspondem a teflubenzuron (inseticida), diuron e atrazina (herbicidas), incluindo dois dos principais metabólitos da atrazina: desisopropil-atrazina e desetil-atrazina.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1: Desenvolver uma metodologia analítica via LC-DAD para a determinação simultânea de DIU, TFB, ATZ, DIA e DEA.

2: Estudar a extração de DIU, TFB, ATZ, DIA e DEA de amostras aquosas, utilizando-se sistema de extração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

3: Introduzir modificações no sistema de extração anterior, de maneira a permitir a sua operação na forma de sistemas homogêneos de extração (HLLME).

4: Avaliar a performance dos sistemas anteriores na determinação dos pesticidas modelo em amostras de águas naturais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS E INSUMOS

Os solventes empregados para a determinação cromatográfica foram acetonitrila grau HPLC (99,99 %, JTBaker) e água ultrapura obtida por osmose reversa e posteriormente deionizada (18,2 MΩ cm, Millipore-Simplicity UV, Bedford, MA, USA). Todas as amostras aquosas foram preparadas em água ultrapura. Os padrões dos analitos utilizados, adquiridos da Sigma Aldrich, estão listados na Tabela 3.

TABELA 3: RELAÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS NO PRESENTE TRABALHO.

Padrões	CAS	Pureza
Desisopropil-atrazina (DIA)	1007-28-9	96 %
Desetil-atrazina (DEA)	6190-65-4	99,0 %
Atrazina (ATZ)	1912-24-9	98,8 %
Diuron (DIU)	330-54-1	>98 %
Teflubenzuron (TFB)	83121-18-0	98,8 %

O clorofórmio e o diclorometano utilizados como extratores foram de grau cromatográfico (99,99 %, Sigma-Aldrich). Metanol, acetonitrila e acetona utilizados como solventes dispersores foram de grau HPLC (99,99 %, JTBaker). O sulfato de magnésio anidro empregado na HLLME foi de grau analítico PA (≥98,0 %, Sigma Aldrich). Outros solventes e reagentes empregados, como etanol, tolueno, cicloexano e cloreto de sódio também foram de grau analítico PA. As extrações foram realizadas em tubos para centrífuga de polipropileno de 15 mL com tampas rosqueadas (Kasvi, K19-0015).

Os materiais e vidrarias empregados no trabalho foram previamente calibrados. A descontaminação das vidrarias e tubos foi realizada por lavagem com álcool etílico comercial, água da torneira e banho de HNO₃ 10 % por 24 h, seguido de enxague com água de torneira, água destilada, água deionizada, e secos ao ar ou em estufa.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido (Varian 920-LC), equipado com amostrador automático, detector com arranjo de diodo (DAD), coluna C18 (microsorb-MV100-5, 250 x 4,6 mm, 5 µm), pré-coluna C18 de mesma marca e software GALAXIE v 1.9. As pesagens foram efetuadas em balanças analíticas digitais OHAUS Adventure ProAV264P (± 0,1 mg) e Mettler-

Toledo XS205DU com precisão de $\pm 0,01$ mg. A agitação das amostras foi realizada em vortex B. Braun Biotech International Certomat MV, e a centrifugação em centrífuga Eppendorf 5702.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparo das soluções estoque

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos analitos, na concentração de 100 mg L^{-1} , pesando-se $1,00 \text{ mg}$ dos padrões em balança analítica ($\pm 0,01 \text{ mg}$), e diluindo-os em $10,00 \text{ mL}$ (micropipeta Brand Transferpette S) de metanol grau cromatográfico. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração a -20°C . A partir destas soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho através da diluição em água ou em fase móvel.

4.2.2. Análise cromatográfica e curvas analíticas

A otimização das condições cromatográficas, bem como, das curvas analíticas foram estabelecidas com base na literatura (CARBO *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2012; CALIFORNIA DEPT. OF FOOD & AGRICULTURE, 1998; AMARAL *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012).

A partir destas informações, um modo de eluição gradiente foi desenvolvido para a determinação simultânea dos analitos, sendo otimizados parâmetros como o volume de injeção, a vazão, a temperatura da coluna, bem como, as condições de variação do gradiente acetonitrila:água, de modo a garantir uma adequada separação entre os analitos.

A condição otimizada consistiu numa eluição por gradiente de acetonitrila:água (v/v), com uma composição inicial de 40 % de acetonitrila, aumentando linearmente até 90 % de 8 min a 14 min, mantendo a 90 % por 19 min e retornando linearmente às condições iniciais até 22 min. Foram injetados $50 \mu\text{L}$ de amostra, sob vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ à temperatura de 40°C .

Foram avaliadas curvas analíticas por padronização externa em 13 níveis de concentração ($n=3$) a partir da diluição das soluções estoque entre $2,50$ a $2500 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo os padrões preparados na proporção inicial da fase móvel (acetonitrila:água

40:60, v/v), o que permitiu a completa solubilização dos analitos na faixa de concentração avaliada. Os analitos foram monitorados por detecção no ultravioleta por DAD nos comprimentos de onda de máxima absorção: DIA e DEA em 215 nm, ATZ em 223 nm, DIU 254 nm e TFB em 200 nm.

4.2.3. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Os padrões aquosos contendo os analitos foram submetidos a processos de DLLME, utilizando-se procedimentos baseados na literatura (MARTINS *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2011; NAGAJARU e HUANG, 2007; CHOU *et al.*, 2009; CALDAS *et al.*, 2010). Para a otimização das condições de extração DLLME (ex. volume e o tipo de solvente extrator, volume e tipo de solvente dispersor) foram empregados sistemas univariados, e planejamentos de experimentos via modelagem de misturas.

4.2.3.1. Avaliação do solvente extrator e dispersor

A escolha dos solventes extrator e dispersor foi realizada de forma univariada por meio de ensaios em triplicata empregando-se 300 µL de solvente extrator com 1,000 mL dos diferentes solventes dispersores. A Tabela 4 sumariza as principais características físico-químicas dos solventes empregados nesta etapa. Com o auxílio de micropipetas Transferpette S (Brand) os solventes foram adicionados à 5,00 mL de amostra, preparada em água ultrapura e fortificada com 30,0 µg L⁻¹ de cada analito. Nas condições investigadas foi possível a completa solubilização dos analitos nas amostras fortificadas.

TABELA 4. SOLVENTES EMPREGADOS NOS ENSAIOS PRELIMINARES E ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.

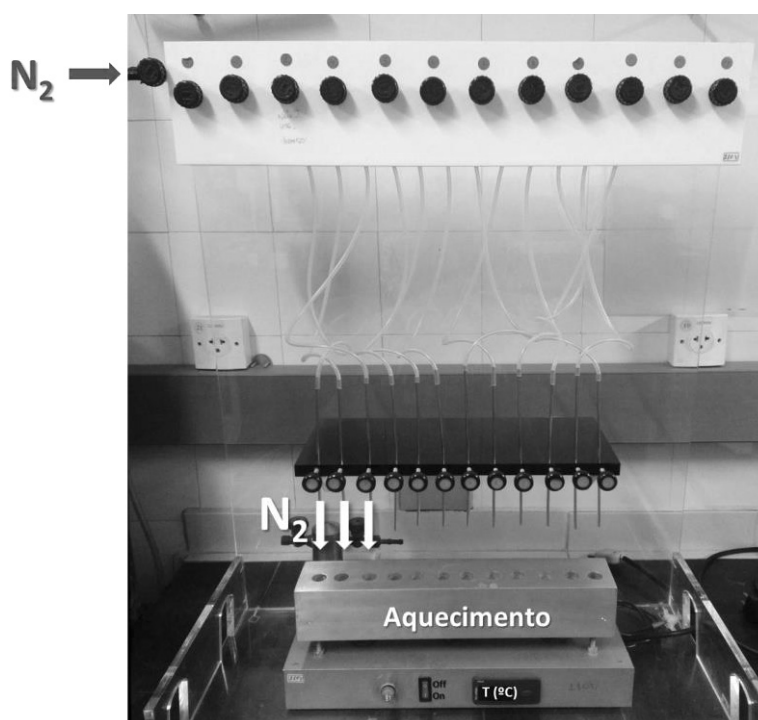
	Solvente	log K_{ow}	Densidade (g cm ⁻³)
Extrator	Diclorometano (DCM)	1,5	1,33
	Clorofórmio (CLO)	2,0	1,47
	Tolueno (TOL)	3,0	0,824
	Ciclohexano	2,5	0,87
	n-Octanol	3,44	0,78
Dispersor	Acetona	- 0,23	0,791
	Metanol (MeOH)	- 0,76	0,792
	Etanol (EtOH)	- 0,24	0,789
	Acetonitrila (ACN)	- 0,33	0,786

Para os solventes de maior densidade que a água, os ensaios foram realizados em tubos de polipropileno de 15 mL, empregando-se agitação em vortex por 30 s, seguida de centrifugação por 6 min a 4400 rpm.

Já para os solventes menos densos os ensaios foram realizados em balões volumétricos de 5,00 mL com gargalos longos, a fim de facilitar a coleta do extrato sobrenadante após a extração. Os balões foram agitados manualmente de forma vigorosa por 30 s, e deixados em repouso até a completa separação das fases.

Toda a fase sedimentada (no caso do uso de solventes extratores mais densos que a água)/sobrenadante (no caso do emprego dos solventes extratores menos densos que a água) foi coletada com o auxílio de uma seringa de vidro equipada com agulha de aço inox, evitando-se a coleta da fase aquosa, o que poderia dificultar a etapa de secagem e/ou introduzir contaminantes ao extrato orgânico. Todo o extrato coletado foi transferido para um frasco de 2 mL, completamente evaporado sob fluxo suave de N_2 , reconstituído em 250 μ L de água, e analisado por LC-DAD. A figura 5 ilustra o sistema desenvolvido no laboratório para a secagem das amostras sob fluxo de N_2 . Apesar do volume de injeção do método cromatográfico ser de apenas 50 μ L, havia necessidade de reconstituir as amostras em 250 μ L, uma vez que este se trata do volume mínimo necessário para que a agulha de injeção do LC não colete ar no momento da amostragem.

FIGURA 5. SISTEMA DE SECAGEM DE AMOSTRAS SOB FLUXO DE N_2 .



A fim melhorar a recuperação para os analitos mais polares (DIA e DEA), foram realizados ensaios empregando como agente extrator uma mistura de clorofórmio (300 μL) e diclorometano (200 μL), e 1,000 mL dos solventes dispersores (acetonitrila, acetona, metanol e etanol).

Após a determinação dos solventes extrator e dispersor de melhor desempenho, foram realizadas modelagens de misturas ternárias, a fim de estabelecer as melhores proporções entre os solventes, fixando-se 100 % como sendo 1,500 g da mistura de solventes extratores e dispersor. Para facilitar o preparo das misturas de solventes, as proporções em massa de cada ensaio das modelagens de misturas foram convertidas a valores de volume por meio das respectivas densidades (Tabela 4).

Nestes ensaios foram empregados 5,00 mL de amostra preparada em 10 % (m/v) de NaCl, fortificada com 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos analitos, mantendo-se as condições de agitação, centrifugação e secagem descritas anteriormente. Modificou-se apenas a etapa de reconstituição, que após a secagem foram empregados 250 μL de acetonitrila:água (40:60, v/v).

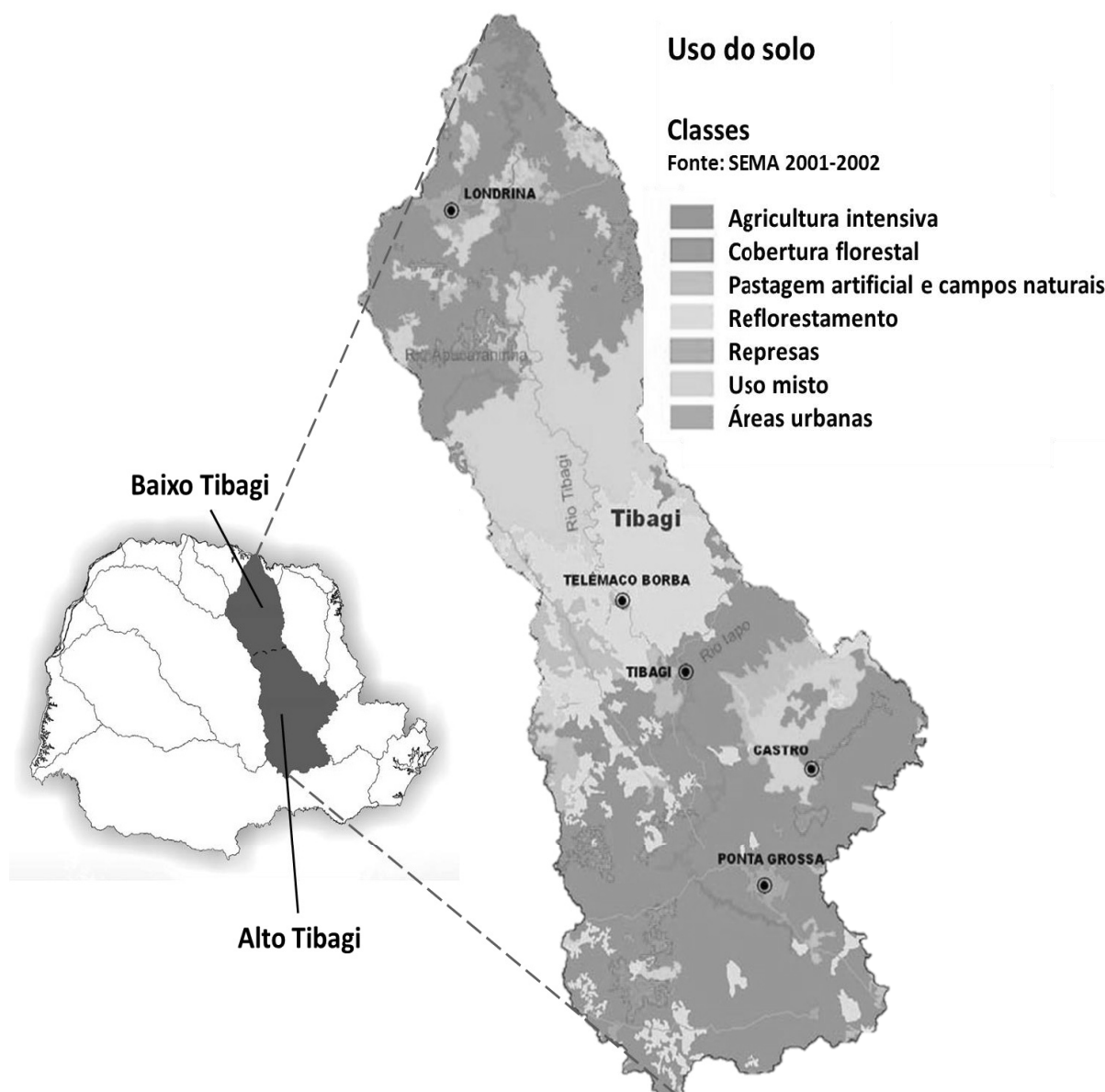
A análise estatística das recuperações obtidas para os analitos nos planejamentos experimentais foi realizada no software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

Após otimização via modelagem de misturas, foi avaliada a quantidade em massa da mistura dos solventes na recuperação dos analitos ($n = 3$; 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), por meio de ensaios empregando 0,800; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,00 g da mistura de solventes.

4.2.3.2. Análise de amostras reais

As amostras de águas naturais foram coletadas na região leste do estado do Paraná na bacia do rio Tibagi (Figura 6) sendo a água de lago coletada no Alagados (Latitude: 25°01'11,2"; Longitude: 50°03'41,3", responsável pelo abastecimento de água da cidade de Ponta Grossa. Já as amostras de água de nascente (Latitude: 24°48'31,8"; Longitude: 50°03'11,9") e do rio Iapó (Latitude 24°41'07,0"; Longitude: 49°52'13,8") foram coletadas na cidade de Castro.

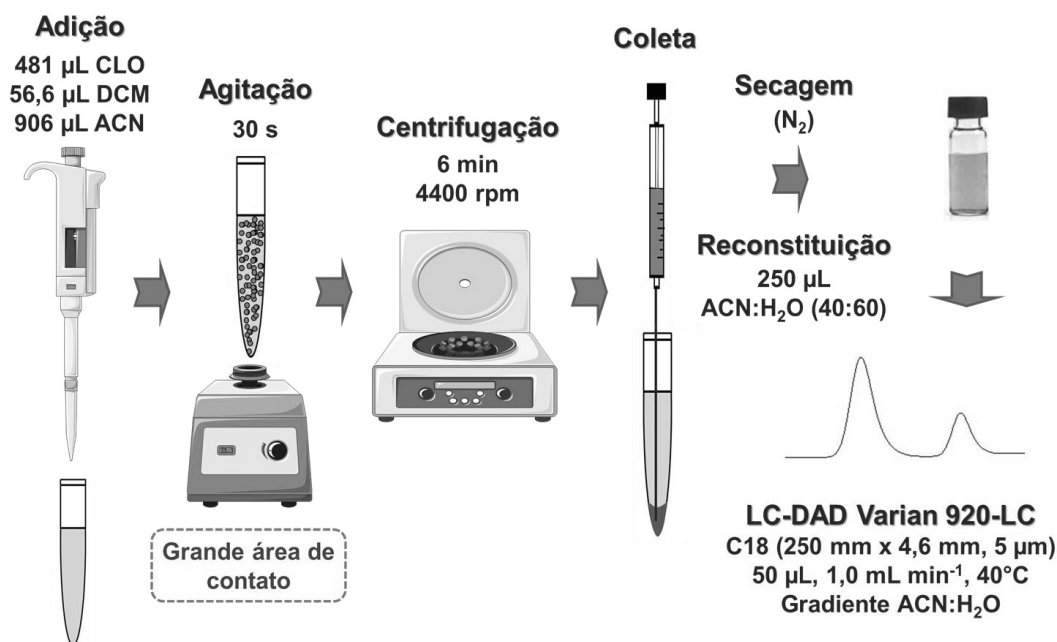
FIGURA 6. USO DO SOLO NA REGIÃO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TIBAGI-PARANÁ.



FONTE: ADAPTADO DE SEMA (2010).

Todas as amostras foram filtradas através de membrana de fibra de vidro de 0,45 µm (Macherey-Nagel, Alemanha) e armazenadas em frascos de vidro âmbar a 4 °C antes da análise. Foram então fortificadas com diferentes níveis de cada analito e submetidas a rotina de DLLME otimizada (Figura 7), seguido de validação.

FIGURA 7. CONDIÇÕES OTIMIZADAS DO MÉTODO DLLME-LC-DAD.

FONTE: ADAPTADO DE *SERVIER MEDICAL ART*.

4.2.3.3. Validação do método DLLME-LC-DAD

O método otimizado foi validado de acordo com as recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2016) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

A linearidade foi investigada por padronização externa (curvas instrumentais), sendo as amostras preparadas na composição inicial do gradiente da fase móvel (acetonitrila:água 40:60, v/v), na faixa de concentração entre 2,50 a 2500 µg L⁻¹ (n=3), e por superposição de matriz em 6 níveis de concentração entre 0,5 e 100 µg L⁻¹ (n=3). A sensibilidade foi estimada pelo coeficiente angular médio das três curvas independentes.

A detectabilidade instrumental e do método foi avaliada com base nas curvas analíticas (padronização externa e superposição de matriz respectivamente), por meio dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). O LOD foi estimado pela relação entre a estimativa do desvio do intercepto (*s*) e a inclinação da curva de analítica (*S*) ($LOD=3 s/S$). Já o LOQ, que está associado a menor concentração quantitativamente determinada, com valores aceitáveis de precisão e exatidão, foi estimado por dez vezes a razão *s/S* ($LOQ=10 s/S$) (ANVISA, 2003).

Os fatores de enriquecimento (FE) foram estimados de pela equação 14:

$$FE = \frac{\text{concentração determinada experimentalmente}}{\text{concentração esperada}} \quad (14)$$

A seletividade do método foi avaliada pela pureza dos picos cromatográficos, por meio da comparação entre os espectros UV, gerados pelo detector DAD, das bandas de eluição dos analitos nos extratos e nos padrões puros. A seletividade foi ainda evidenciada pela ausência de compostos coeluinto com os analitos, o que foi confirmado pela comparação entre a análise das amostras reais com e sem fortificação.

A precisão do método foi avaliada por meio da extração em triplicata nas amostras reais fortificadas em três níveis de concentração (baixa, média e alta). Os níveis de fortificação foram escolhidos a fim de varrer toda a faixa linear das curvas analíticas. Ou seja, após a pré-concentração, o nível baixo de concentração ficou próximo ao LOQ da padronização externa ($\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$), no médio cerca de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, e no alto aproximadamente $2000 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os resultados foram avaliados por meio dos coeficientes de variação (CV, equação 15) em %, obtidos nos ensaios de repetibilidade, realizados no mesmo dia (*intra-day*) e de precisão intermediária, com ensaios realizados em dois dias diferentes (*inter-day*).

$$CV(\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100 \quad (15)$$

Para a estimativa do CV *intra-day* foram consideradas as recuperações obtidas para as triplicatas dos dois dias diferentes, totalizando assim seis amostras.

A exatidão do método de extração foi investigada por meio de ensaios de recuperação absoluta nas amostras reais, nos mesmos níveis de fortificação dos ensaios de precisão para as amostras da primeira coleta (três níveis em sextuplicata). Os valores de recuperação foram estimados de acordo com a equação 16:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad (16)$$

Sendo:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada

C2 = concentração determinada na amostra sem fortificação (branco)

C3 = concentração adicionada

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden (INMETRO, 2016), empregando amostra real (rio Iapó) fortificada com $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito. Os sete parâmetros avaliados foram vazão (A – $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; a – $0,9 \text{ mL min}^{-1}$), temperatura da coluna (B – 40°C ; b – $42,5^\circ\text{C}$), temperatura de secagem (C – temperatura ambiente; c – 30°C), tempo de agitação (D – 30 s; d – 25 s), tempo de centrifugação (E – 6 min; e – 5 min), velocidade de centrifugação (F – 4400 rpm; f – 4200 rpm), e % NaCl (m/v) (G – 10 %; g – 9,5 %).

A avaliação do efeito de cada fator pode ser realizada com base nas respostas obtidas em cada ensaio, sendo a recuperação absoluta (%) a resposta de interesse avaliada neste estudo. O cálculo do efeito de cada fator pode ser realizado pela comparação entre a média das respostas nominais (fatores denominados com letras maiúsculas) com a média das respostas para as respectivas variações (em letras minúsculas) (Tabela 5, última linha). Assim, a equação para o cálculo do efeito da vazão (A/a) por exemplo, seria:

$$Vazão = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4} \quad (17)$$

TABELA 5: MATRIZ DOS FATORES EMPREGADOS PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.

Fatores	Combinação dos fatores							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Vazão ($1,0\text{-}0,9 \text{ mL min}^{-1}$)	A	A	A	A	a	a	a	a
T coluna ($40 - 42,5^\circ\text{C}$)	B	B	b	b	B	B	b	b
T secagem ($T_{\text{amb}} - 30^\circ\text{C}$)	C	c	C	c	C	c	C	c
t agitação (30 - 25s)	D	D	d	d	d	d	D	D
t centrífuga (6 – 5 min)	E	e	E	e	e	E	e	E
Velocidade de centrífuga (4400- 4200 rpm)	F	f	f	F	F	f	f	F
NaCl (10 – 9,5 % m/v)	G	g	g	G	g	G	G	g
Resposta	S	t	u	v	W	X	y	z

4.2.4. Superposição de matriz (“*matrix-matched*”)

A fim de avaliar efeito de matriz foi realizada uma nova amostragem no rio Iapó e na Nascente. Foram então construídas curvas analíticas em seis níveis de concentração (0,50; 1,00; 5,0; 10,0; 50,0 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n=3$) via superposição de matriz (“*matrix-matched*”), empregando o método DLLME-LC-DAD otimizado tanto nas amostras reais quanto em água ultrapura nos mesmos níveis de fortificação para fins comparativos.

4.2.5. Microextração líquido-líquido homogênea (HLLME)

A fim de estabelecer um método de extração em meio homogêneo a partir do método DLLME otimizado, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 preliminar variando-se o volume de acetonitrila, clorofórmio e diclorometano, nas condições descritas na Tabela 6. O ponto central foi avaliado em triplicata a fim de estimar a variância do sistema.

TABELA 6: FATORES E NÍVEIS DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO 2^3 PARA A RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EM ÁGUA.

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Volume de CLO (μL)	0	25,0	50,0
Volume de DCM (μL)	0	25,0	50,0
Volume de ACN (mL)	1,00	1,50	2,00

Estes ensaios foram realizados em tubos Kasvi de 15 mL, por meio da extração de 5,00 mL de amostra aquosa fortificada com 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos analitos. Após a adição dos solventes as amostras foram agitadas em vortex por 30 s a fim de garantir a homogeneidade da solução. A separação das fases foi então promovida com base no efeito *salting out* através da adição de 1,000 g de sulfato de magnésio anidro PA (>99,8 %, Sigma Aldrich), seguida de agitação em vortex por 30 s e centrifugação por 3 min a 4400 rpm. Toda a fase sobrenadante foi coletada com uma seringa de vidro equipada com agulha de aço inox, evaporada sob fluxo de N_2 , reconstituída na fase móvel, e analisada por LC-DAD.

Com a finalidade de reduzir a quantidade de reagentes empregados, bem como, elevar o fator de enriquecimento dos analitos, foi realizado um segundo

planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para avaliar a quantidade de sulfato de magnésio, o volume da amostra e o volume de acetonitrila, sendo os níveis investigados apresentados na Tabela 7.

TABELA 7: FATORES E NÍVEIS DO SEGUNDO PLANEJAMENTO 2^3 PARA A OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MÉTODO HLLME.

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Massa de MgSO_4 (%m/v)	30	35	40
Volume amostra (μL)	5,00	7,50	10,0
Volume de ACN (mL)	1,25	1,50	1,75

Nestes ensaios seguiram-se os mesmos procedimentos descritos para o primeiro planejamento, com exceção do tempo de centrifugação, que foi de 6 min a fim de garantir uma melhor separação das fases após a etapa de *salting out*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Para a otimização da separação cromatográfica foram testadas diferentes condições com base na literatura (CARBO *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2012; CALIFORNIA DEPT. OF FOOD & AGRICULTURE, 1998; AMARAL *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012). Foram avaliados parâmetros como volume de injeção (30 e 50 μL), vazão da fase móvel (0,9 e 1,0 mL min^{-1}), temperatura da coluna (temperatura ambiente e 40 $^{\circ}\text{C}$), bem como diferentes condições de eluição por gradiente acetonitrila:água.

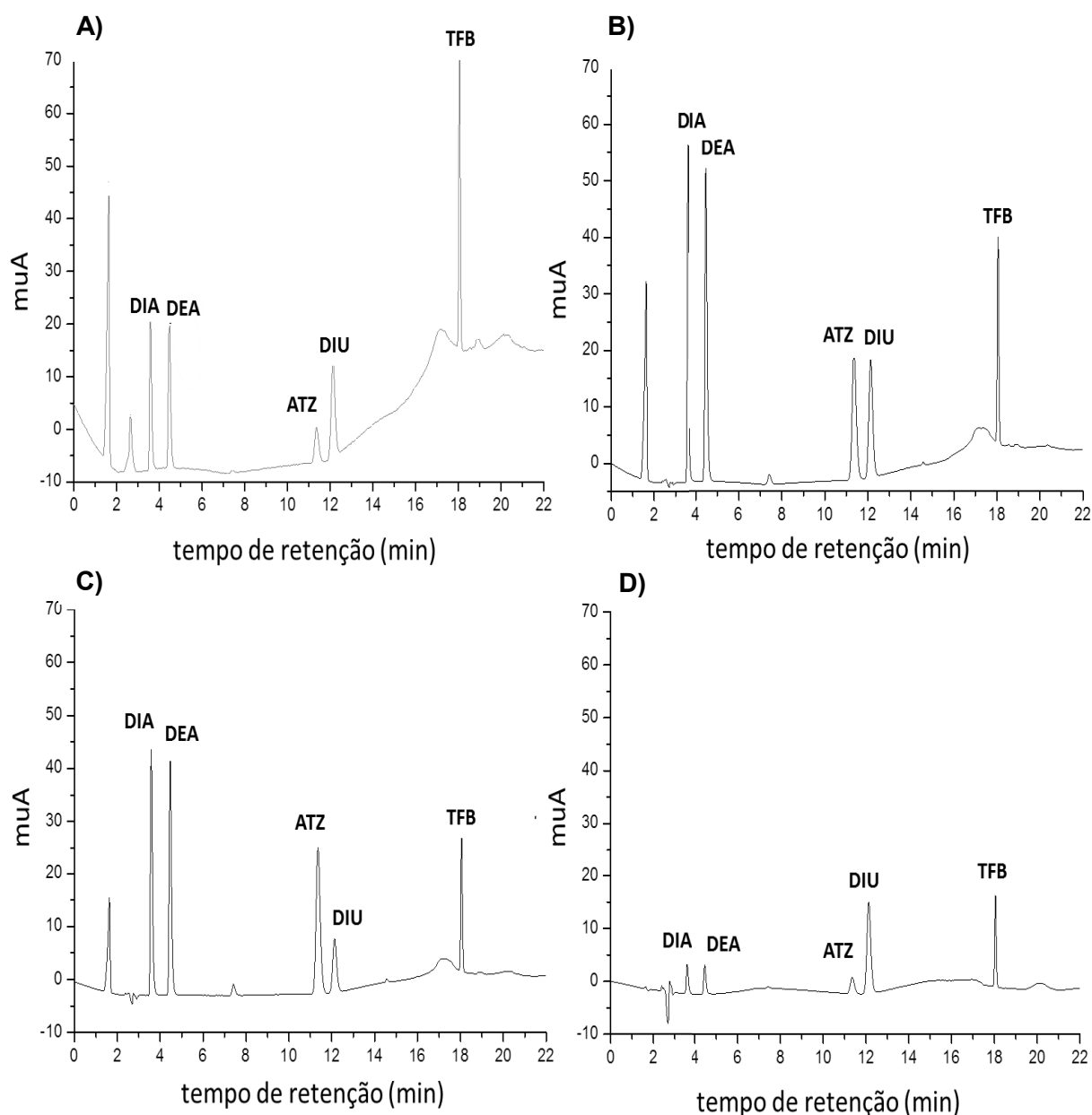
Optou-se por manter a vazão em 1,0 mL min^{-1} pois em menores vazões havia um maior alargamento das bandas de eluição, dificultando a resolução entre analitos ATZ e DIU. O volume de injeção foi fixado em 50 μL pois volumes inferiores reduziam significativamente a intensidade dos picos, devido à menor quantidade de analito injetada, o que poderia elevar os LOD e LOQ do método. A temperatura da coluna foi mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$, o que facilita a transferência de massa permitindo um menor alargamento das bandas de eluição, melhorando assim a resolução entre ATZ e DIU. Além disso, manter a temperatura da coluna acima da ambiente evita variações devido a oscilações ambientais, o que garantiu maior reprodutibilidade ao método cromatográfico.

Assim, as melhores condições de separação para a determinação simultânea dos analitos foram obtidas ao se empregar eluição por gradiente acetonitrila:água (v/v), iniciando com 40 % de acetonitrila, aumentando para 90 % entre 8 min e 14 min, mantendo a 90 % até 19 min e retornando linearmente às condições iniciais até 22 min.

Na Figura 8 são mostrados os cromatogramas obtidos nas melhores condições de monitoramento, ou seja, nos comprimentos de máxima absorção na região do UV ($\lambda_{\text{máx}}$) para cada uma das espécies de interesse. Estes valores foram selecionados a partir dos espectros gerados pelo DAD no t_R de cada analito: 215 nm para DIA e DEA, 223 nm para ATZ, 254 nm para DIU e 200 nm para TFB, como pode ser evidenciado pela maior intensidade das bandas de eluição dos analitos nos comprimentos de onda mencionados. Observou-se uma boa separação dos picos

cromatográficos, sendo que os tempos de retenção foram de 3,57 min para DIA, 4,48 min DEA, 11,40 min ATZ, 12,23 min DIU e 18,11 min para TFB.

FIGURA 8. CROMATOGRAMAS OBTIDOS PELO MÉTODO LC-DAD OTIMIZADO. ANÁLISE DE UMA MISTURA DOS PADRÕES ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) PREPARADA NA FASE MÓVEL (ACETONITRILA:ÁGUA, 40:60, v/v). MONITORAMENTO EM A) 200 nm; B) 215 nm; C) 223 nm; D) 254 nm.



Os tempos de retenção de ATZ e DIU mostram-se elevados, pois estes compostos coeluíam nas condições de gradiente cuja composição da acetonitrila era elevada mais rapidamente. Por este motivo, o intervalo de tempo de 6 min foi

necessário para aumentar a proporção de acetonitrila até 90 % e obter uma mínima resolução (R) dos picos, estimada pela equação 18:

$$R = \frac{2 \Delta t_R}{b_1 + b_2} \quad (18)$$

sendo Δt_R a diferença entre os tempos de retenção dos analitos e b_i a largura da bases da banda de eluição do analito i .

Como a absorção da ATZ em 254 nm não é muito expressiva, a resolução entre os picos era crítica apenas em 223 nm, assim nas condições otimizadas de gradiente foi obtida uma resolução aceitável mesmo em elevadas concentrações ($R=1,04$, $500 \mu\text{g L}^{-1}$).

Devido à baixa polaridade do TFB ($\log K_{ow}$ 4,3), só foi possível obter sua eluição ao se atingir 90 % de acetonitrila na fase móvel, o que elevou o tempo necessário para cada corrida.

5.2. CURVAS ANALÍTICAS

Após a definição das condições cromatográficas de análise (método1), foi realizada a padronização externa dos analitos em triplicata por LC-DAD. Uma primeira curva analítica, preparada em água, foi desenvolvida na faixa de 2,50 a $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ a fim de determinar as recuperações dos ensaios preliminares para a escolha dos solventes extratores e dispersores, cujas fases sedimentadas foram evaporadas sob fluxo de N_2 e reconstituídas em água ultrapura.

Devido à baixa solubilidade do TFB em água ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$), os resultados demonstraram uma baixa recuperação deste analito após a extração via DLLME com reconstituição em água. Assim, foi necessário construir novas curvas analíticas por padronização externa (Figura 9), preparando as amostras na composição inicial da fase móvel do gradiente, composta por acetonitrila:água (40:60, v/v), o que permitiu a completa solubilização do analito na faixa de concentração avaliada ($10,0$ a $2500 \mu\text{g L}^{-1}$). Os parâmetros obtidos via mínimos quadrados e algumas figuras de mérito analítico destas curvas estão apresentados na Tabela 8. As concentrações

inferiores aos respectivos LOQ não foram empregadas na construção das curvas analíticas, sendo estas avaliadas apenas na faixa linear, conforme a Tabela 8.

FIGURA 9. A) CURVAS ANALÍTICAS MÉDIAS OBTIDAS POR LC-DAD PARA DIA (215 nm), DEA (215 nm), ATZ (223 nm), DIU (254 nm) E TFB (200 nm). B) AMPLIAÇÃO DAS CURVAS. MÉTODO CROMATOGRÁFICO 1.

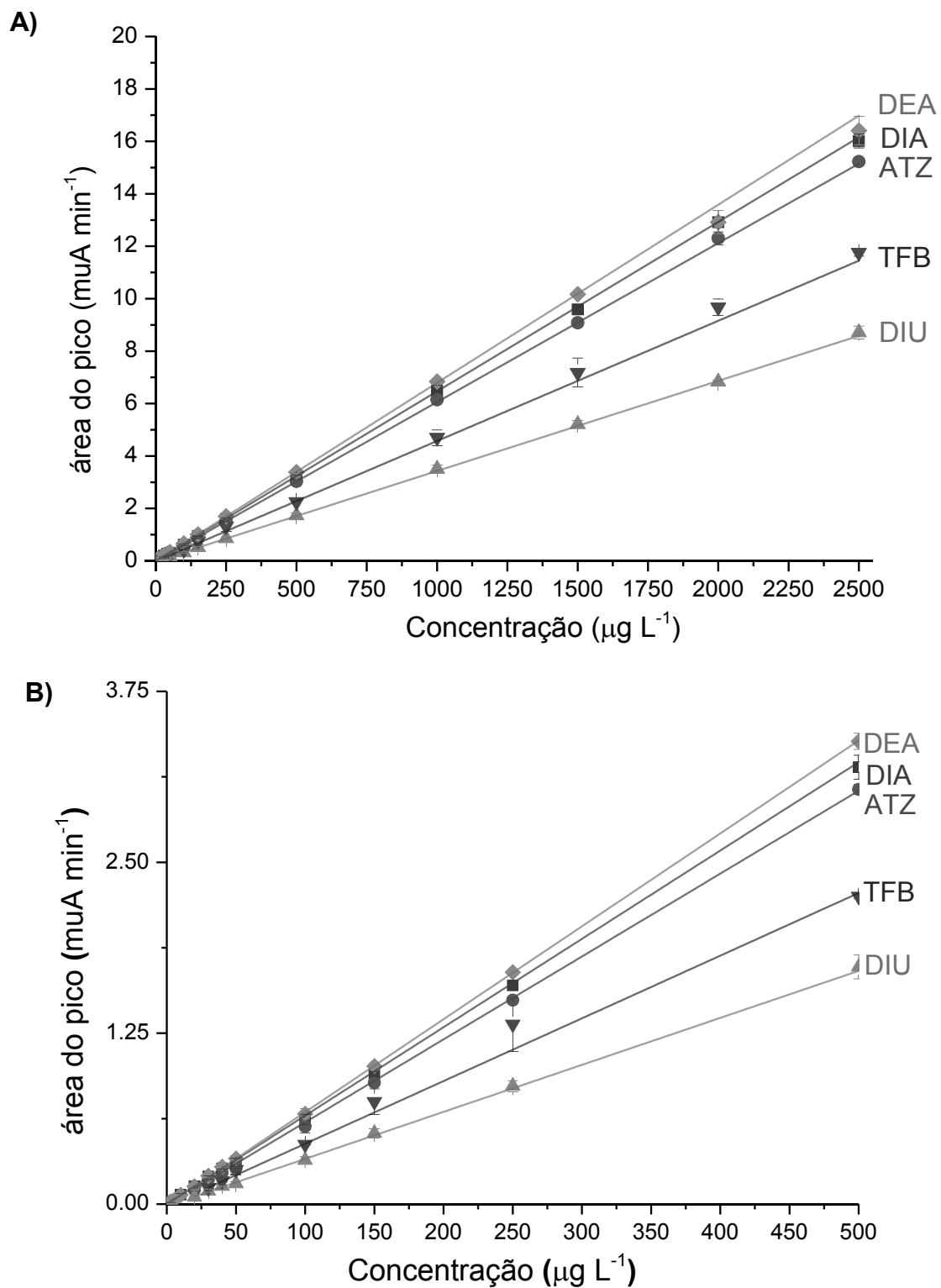


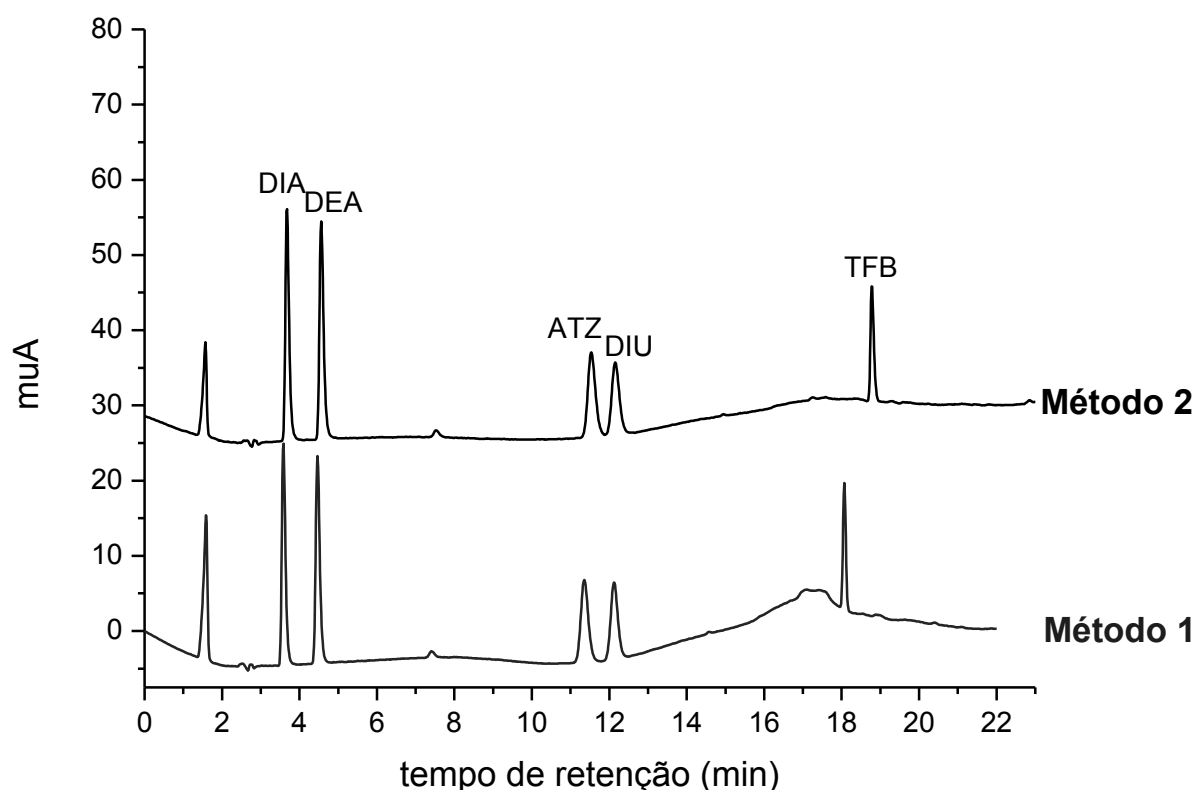
TABELA 8: PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDAS POR LC-DAD. CURVA ANALÍTICA PREPARADA NA FASE MÓVEL. MÉTODO 1.

Parâmetros	DIA (215 nm)	DEA (215 nm)	ATZ (223 nm)	DIU (254 nm)	TFB (200 nm)
Coeficiente Linear (a)	0,000350	0,00757	0,00868	-0,0139	-0,0182
s de a	0,00143	0,000412	0,00313	0,00213	0,00379
Coeficiente Angular (b)	0,00646	0,00677	0,00606	0,00344	0,00459
s de b	0,0000465	0,00483	0,0000293	0,0000174	0,0000372
Coeficiente de correlação (r)	0,9997	0,9998	0,9999	0,9999	0,9997
Faixa linear	2,50-2500	2,5-2500	10,0-2500	10,0-2500	10,0-2500
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,66	0,18	1,3	1,6	2,3
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,2	0,61	4,4	5,2	7,6

Analisando as curvas analíticas preparadas na fase móvel (Tabela 8) é possível perceber uma boa linearidade para todos os compostos ($r > 0,9997$) na faixa de concentração estudada, sendo os coeficientes de correlação superiores a 0,990 como é recomendado pela ANVISA (2003). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram estimados de acordo com recomendações da ANVISA (2003), e estão próximos ao descrito pela literatura (CARBO *et al.*, 2008; YOON *et al.*, 2012; CALIFORNIA DEPT. OF FOOD & AGRICULTURE, 1998; AMARAL *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2012), lembrando que até então nenhuma etapa de pré-concentração foi realizada.

Devido à necessidade de troca da coluna e da pré-coluna por consumíveis de mesma dimensões e marca, o gradiente de eluição precisou ser ligeiramente modificado (método 2), uma vez que neste novo sistema ocorria uma leve perda de resolução entre ATZ e DIU ($R=0,91$ a 223 nm, $1000\mu\text{g L}^{-1}$), o que poderia implicar em problemas na quantificação, especialmente para as concentrações mais elevadas. O volume de injeção, a temperatura, a vazão e os comprimentos de onda monitorados foram mantidos, sendo alteradas apenas as condições do gradiente, em que a proporção de acetonitrila na fase móvel passou a ser aumentada mais lentamente: início com 40 % de acetonitrila, aumentando para 90 % entre 8 min e 15 min, mantendo a 90 % até 20 min e retornando linearmente às condições iniciais até 23 min. Nestas condições ocorreu um pequeno atraso na eluição dos analitos, como pode ser evidenciado na Figura 10, sendo que os t_R dos passaram a ser 3,67 min para DIA, 4,56 min DEA, 11,59 min ATZ, 12,31 min DIU e 18,84 min para TFB, sendo a resolução entre ATZ e DIU em 223 nm igual a 1,02 (para uma concentração de $500\mu\text{g L}^{-1}$).

FIGURA 10. CROMATOGRAMAS TÍPICOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS 1 E 2. MONITORAMENTO EM 223 nm.



O método cromatográfico 2 foi empregado na análise das amostras reais via DLLME da segunda coleta, bem como, na construção das curvas analíticas por superposição de matriz empregando o método DLLME otimizado na amostra do rio Iapó, da Nascente e em água ultrapura.

Este método foi ainda utilizado para a construção de novas curvas analíticas por padronização externa, nos mesmos níveis da anterior, que foram empregadas na quantificação dos ensaios de otimização da HLLME (segundo planejamento fatorial 2^3 , item 5.5). A Tabela 9 apresenta os principais parâmetros de mérito das curvas analíticas obtidas empregando-se o método 2, na qual é possível evidenciar a adequada linearidade obtida ($r > 0,9993$) para a determinação de todos os analitos.

TABELA 9: PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS OBTIDAS POR LC-DAD. CURVA ANALÍTICA PREPARADA NA FASE MÓVEL. MÉTODO 2.

Parâmetros	DIA (215 nm)	DEA (215 nm)	ATZ (223 nm)	DIU (254 nm)	TFB (200 nm)
Coeficiente Linear (a)	-0,00392	0,00248	-0,00042	-0,0082	0,0071
s de a	0,00210	0,00377	0,00301	0,00281	0,00372
Coeficiente Angular (b)	0,00720	0,00475	0,00635	0,00277	0,00487
s de b	0,0000547	0,0000207	0,0000581	0,0000268	0,0000602
Coeficiente de correlação (r)	0,9998	0,9999	0,9996	0,9997	0,9993
Faixa linear	5,00-2500	10-2500	10,0-2500	10,0-2500	10,0-2500
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,87	2,4	1,5	3,0	2,3
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,9	7,9	4,9	10	7,6

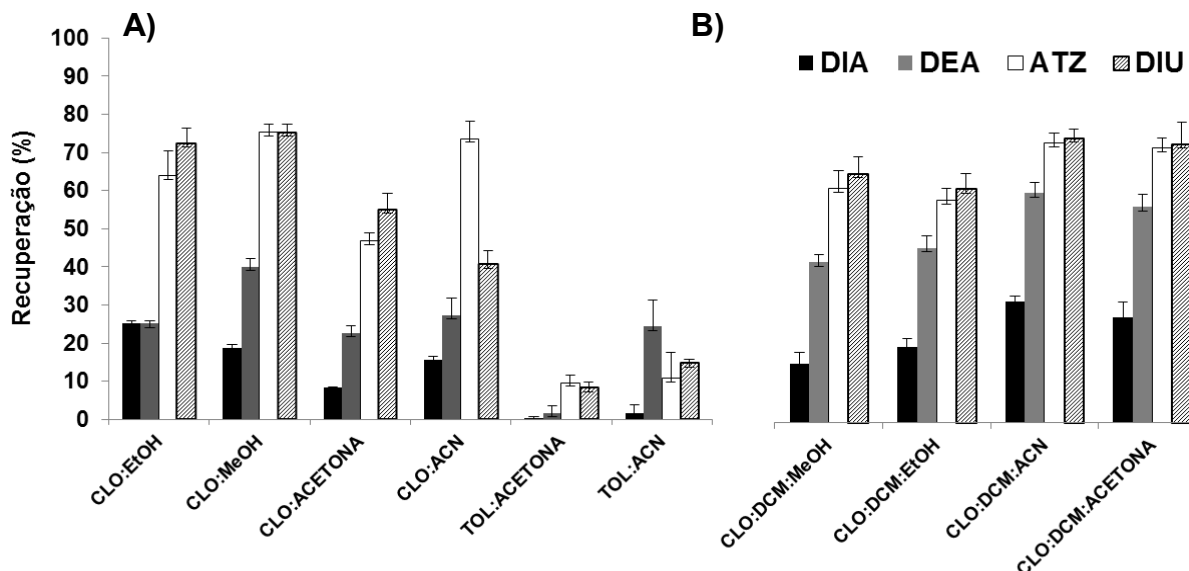
5.3. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DLLME

5.3.1. Avaliação dos solventes extrator e dispersor

Ensaio preliminares empregando diferentes misturas de solventes extratores e dispersores foram realizados a fim de escolher uma composição de melhor desempenho para a extração simultânea dos analitos. A escolha dos solventes de extração e de dispersão foi realizada com base na literatura (MARTINS *et al.*, 2012; CALDAS *et al.*, 2011; NAGAJARU e HUANG, 2007; CHOU *et al.*, 2009; CALDAS, COSTA E PRIMEL, 2010) e nos coeficientes de partição dos analitos e dos solventes. Os volumes de solvente empregados foram escolhidos a fim de se obter cerca de 500 μL de extrato orgânico, garantindo assim não apenas a pré-concentração dos analitos, mas também a adequada precisão na etapa da coleta dos extratos, sem ainda comprometer o tempo necessário para a secagem sob fluxo de N_2 .

A Figura 11 relaciona as recuperações dos analitos com o tipo de solvente extrator e dispersor empregados para a determinação dos compostos em 5,00 mL de uma solução padrão fortificada com $30,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos analitos.

FIGURA 11. ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES E DISPERSORES. A) DLLME CONVENCIONAL B) DLLME COM DUPLO SOLVENTE EXTRATOR. SIGLAS: CLOROFÓRMIO (CLO), DICLOROMETANO (DCM), ETANOL (ETOH), METANOL (MeOH), TOLUENO (TOL), ACETONITRILA (ACN).



Nestes experimentos toda a fase sedimentada/sobrenadante foi coletada, seca sob fluxo suave de N_2 e reconstituída em 250 μ L de água ultrapura. Portanto, para estes ensaios, a quantificação foi realizada com base nas curvas analíticas preparadas em água ultrapura. Ainda, nas condições investigadas nesta etapa não foi possível recuperar o TFB em nenhum dos ensaios, como será discutido na seção 5.3.2.

O emprego de n-octanol como solvente de extração foi descartado devido ao elevado tempo necessário para sua evaporação sob fluxo de N_2 (ponto de ebulição a 195 °C). Além disso, acrescentar uma segunda etapa de extração dos analitos deste solvente, utilizando um solvente de maior volatilidade ou que pudesse ser diretamente injetado no sistema cromatográfico, não pareceu viável, pois além de perdas na recuperação elevaria significativamente o tempo de preparo das amostras. A aplicação de cicloexano também foi descartada devido às baixas taxas de recuperação, sendo as concentrações determinadas após extração inferiores aos LOQ das curvas de padronização externa dos analitos. Ainda o emprego deste solvente implicou em grande dificuldade na coleta do extrato orgânico sobrenadante, acarretando em baixa precisão do método de extração, fato também observado para o solvente extrator tolueno, principalmente quando associado aos dispersores MeOH e EtOH.

O uso de diclorometano como único solvente extrator também foi inviabilizado devido à dificuldade em se obter a separação de fases orgânica e aquosa nas condições investigadas. Contudo, devido a sua maior polaridade ($\log K_{ow}$ 1,5) optou-se por adicionar este solvente às extrações que empregam clorofórmio como extrator, solvente que havia apresentado melhor desempenho (Figura 11 A), de modo a se trabalhar com uma mistura binária de solventes extratores, o que já vem sendo descrito na literatura (WANG *et al.*, 2014; FARAJZADEH e KHOSH MARAM, 2015). Com isso, foi possível melhorar a recuperação dos analitos mais polares e de maior solubilidade em água (DIA e DEA), especialmente ao se utilizar acetonitrila como dispersor, como se observa na Figura 11 (B). A fim de verificar qual a melhor proporção entre os solventes (extratores e dispersor) para a extração simultânea dos analitos, foram realizadas modelagens de misturas, como será descrito no item 5.3.3.

5.3.2. Solvente de reconstituição

Até então, não havia sido possível obter dados de recuperação para o TFB ($\log K_{ow}$ 4,3) em nenhum dos ensaios realizados, mesmo empregando solventes de baixa polaridade como cicloexano e tolueno nos procedimentos de extração. Tendo em vista a baixa solubilidade do TFB em água e que este analito (pK_a 9,2) se apresenta majoritariamente na forma neutra em pH 4,8 (água ultrapura) (MILHOME *et al.*, 2009), sendo o ajuste de pH desnecessário na análise cromatográfica, optou-se por modificar o solvente de reconstituição das amostras submetidas à extração. Ao reconstituir os extratos na composição inicial da fase móvel houve melhora significativa nos dados de recuperação deste analito, de baixa polaridade e solubilidade em água. Logo, foi realizada a construção de novas curvas analíticas preparadas na fase móvel, para avaliar a recuperação dos analitos empregando-se acetonitrila:água (40:60 v/v) na reconstituição das amostras submetidas à extração por solventes.

Apesar de sua baixa solubilidade em água (0,02 mg L⁻¹), o TFB é bastante solúvel em metanol (1,8 g L⁻¹) (FAO/WHO, 2016), o que pode justificar a ausência de problemas na quantificação deste analito tanto nas curvas analíticas preparadas em água, quanto nas extrações de amostras aquosas fortificadas devido à presença,

ainda que em pequenas quantidades, deste solvente, uma vez este foi empregado para a preparação das soluções estoque (seção 4.2.1.).

Ainda de acordo com a literatura, boa linearidade foi observada para a determinação de TFB entre 1 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ZHANG et al., 2012). As amostras empregadas neste estudo foram obtidas pela diluição de solução estoque (preparada em acetonitrila) em água ultrapura, indicando que a presença de um solvente orgânico, no qual este analito seja bastante solúvel (1,1 g L^{-1} em acetonitrila) (FAO/WHO, 2016) pode elevar significativamente sua solubilidade no meio aquoso.

5.3.3. Modelagem de mistura CLO:DCM:ACN

Nos ensaios realizados empregando-se a mistura CLO:DCM:ACN, que conferiu o melhor desempenho na recuperação dos analitos (seção 5.3.1), foram utilizados 300 μL de CLO, 200 μL de DCM e 1,000 mL de ACN. Considerando as densidades destes solventes (CLO 1,48 g mL^{-1} ; DCM 1,327 g mL^{-1} ; ACN 0,786 g mL^{-1}) é possível estimar a proporção em massa como sendo 0,444 g de CLO; 0,265 g de DCM e 0,786 g de ACN. Logo, a massa total de solvente empregada foi de 1,495 g, ou seja, a proporção em %(m/m) empregada na mistura foi de 29,7%_{CLO}:17,7%_{DCM}:52,6%_{ACN}. Nestas condições as recuperações obtidas foram: 31,4 % DIA, 59,6 % DEA, 72,6% ATZ e 73,9 % DIU.

Neste contexto, a fim de investigar a melhor proporção entre os solventes (extratores (CLO e DCM) e dispersor (ACN)), foram realizadas duas modelagens de mistura de três componentes (CLO:DCM:ACN), fixando-se o 100 % como sendo 1,500 g de solvente. Na primeira modelagem, realizada sem restrições de limites para cada um dos componentes, objetivou-se avaliar a extração de clorofórmio e diclorometano isoladamente, empregando-se acetonitrila como dispersor. Já na segunda modelagem, realizada com restrições, procurou-se avaliar detalhadamente a região contendo as melhores taxas de recuperação, e obter modelos empíricos válidos.

Todos os ensaios foram realizados por meio da extração de 5,00 mL de amostra aquosa fortificada com 30,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos analitos. As amostras foram preparadas em 10,0 % (m/v) de NaCl, a fim de facilitar a separação entre as fases orgânica e aquosa, evitando a obtenção de apenas uma fase, como ocorreu

em todos os ensaios até então realizados empregando DCM como solvente extrator. Além disso, a presença de NaCl eleva a força iônica do meio, promovendo uma melhor extração devido ao efeito *salting out* (CALDAS *et al.*, 2011; NAGARAJU e HUANG, 2007). Após a adição da mistura CLO:DCM:ACN nas proporções de interesse, as amostras foram agitadas em vortex por 30 s e centrifugadas por 6 min a 4400 rpm. Em seguida, toda a fase sedimentada foi coletada, evaporada sob fluxo suave de N₂, reconstituída na fase móvel, e analisada por LC-DAD.

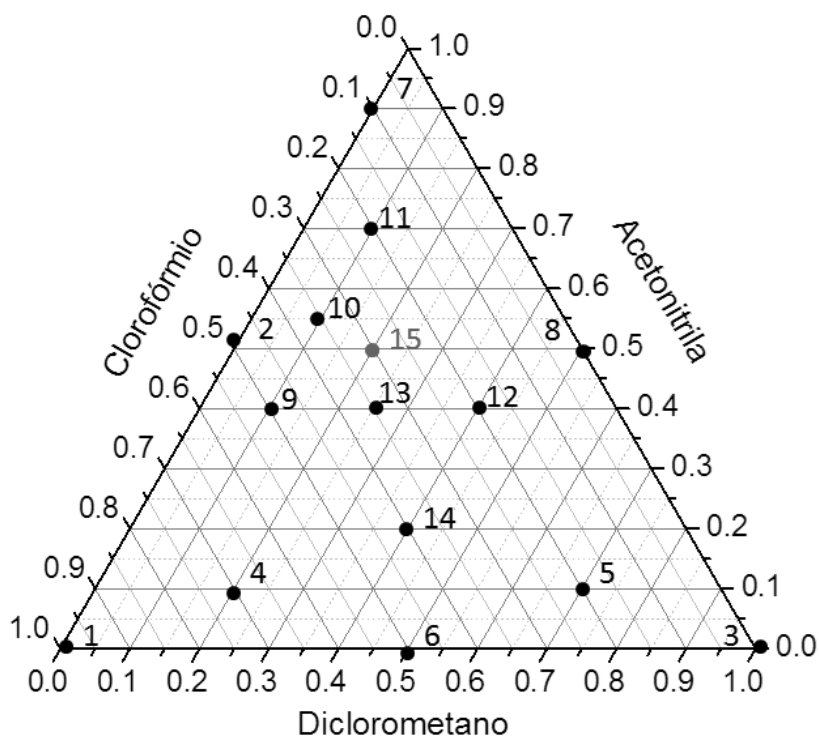
5.3.3.1. Modelagem 1

As condições empregadas na primeira modelagem estão descritas na Tabela 10 e podem ser observadas na Figura 12. Estas composições foram selecionadas a fim de avaliar em um mesmo planejamento o efeito dos dois solventes extratores individualmente sem a presença do solvente dispersor (pontos situados nos vértices do triângulo), o efeito individual do solvente extrator com o solvente dispersor (pontos nas arestas), bem como, o efeito da combinação dos dois solventes extratores com o solvente dispersor em diferentes proporções (pontos internos no diagrama).

TABELA 10: CONDIÇÕES ENSAIADAS NA PRIMEIRA MODELAGEM DE MISTURA. MASSA TOTAL 1,5 g.

Ensaio	% (m:m:m)			Massa de solvente (g)			Volume de solvente (mL)		
	CLO	DCM	ACN	CLO	DCM	ACN	CLO	DCM	ACN
1	100	0	0	1,50	0	0	1,01	0	0
2	50	50	0	0,750	0,750	0	0,507	0,566	0
3	0	100	0	0	1,50	0	0	1,13	0
4	70	20	10	1,05	0,300	0,150	0,709	0,226	0,191
5	20	70	10	0,300	1,05	0,150	0,203	0,792	0,191
6	0	50	50	0	0,750	0,750	0	0,566	0,954
7	10	0	90	0,150	0	1,35	0,101	0	1,72
8	50	0	50	0,750	0	0,750	0,507	0	0,954
9	50	10	40	0,750	0,150	0,600	0,507	0,113	0,763
10	35	10	55	0,525	0,150	0,825	0,355	0,113	1,05
11	20	10	70	0,300	0,150	1,05	0,203	0,113	1,33
12	20	40	40	0,300	0,375	0,825	0,203	0,283	1,05
13	35	25	40	0,300	0,600	0,600	0,203	0,453	0,763
14	40	40	20	0,600	0,600	0,300	0,405	0,453	0,382
15	30	20	50	0,450	0,300	0,750	0,304	0,226	0,954

FIGURA 12. PROPORÇÕES EM MASSA EMPREGADAS NA MODELAGEM 1. O ENSAIO 15, DESTACADO EM VERMELHO, FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.



O ensaio 15 possui condições semelhantes ao ensaio preliminar empregando CLO:DCM:ACN e foi realizado em triplicata para estimar o desvio padrão experimental, totalizando assim 17 experimentos. Não foi realizado o experimento empregando somente ACN devido à impossibilidade de recuperar a fase orgânica nas condições investigadas. As recuperações obtidas nos ensaios estão descritas na Tabela 11.

No ensaio 2, em que não se empregou acetonitrila (Tabela 10), não foi possível recuperar nenhum dos analitos, o que demonstra a importância do solvente dispersor no rápido estabelecimento do equilíbrio entre as fases, permitindo adequadas recuperações em tempos de extração bastante curtos (ANTHEMIDIS e IOANNOU, 2009). Já nos ensaios 6 e 12, que empregam pouco ou nenhum CLO, também não foi possível recuperar os analitos em concentrações superiores aos respectivos LOQ, revelando a importância do CLO para atingir polaridade adequada para a extração.

TABELA 11: RECUPERAÇÕES (%) OBTIDAS PARA OS ANALITOS NA PRIMEIRA MODELAGEM DE MISTURA. O ENSAIO 15 FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.

Ensaio	DIA	DEA	ATZ	DIU	TFB
1	51,1	83,4	99,3	99,5	67,7
2	-	-	-	-	-
3	48,8	78,9	96,0	96,7	82,5
4	52,3	80,1	96,9	96,3	59,6
5	28,3	43,8	52,3	53,1	33,8
6	-	-	-	-	-
7	30,5	48,2	78,8	82,9	53,9
8	45,2	69,7	90,0	91,4	46,3
9	49,0	73,0	94,6	95,0	59,3
10	39,7	59,7	81,0	82,5	51,4
11	52,3	77,5	103,0	100,4	-
12	-	-	-	-	-
13	50,8	74,6	96,0	94,0	52,7
14	51,6	78,2	94,9	94,6	62,2
15	48,8 ± 2,25	72,7 ± 3,06	91,7 ± 4,21	95,1 ± 4,48	64,3 ± 5,76

Apesar da ausência do dispersor, foram obtidas recuperações satisfatórias (>70 %) para a maioria dos analitos nos ensaios 1 e 3, devido à grande quantidade de CLO e DCM empregadas, 1,01 e 1,13 mL respectivamente. Logo, dentre os ensaios realizados, o 15 permitiu boas recuperações para os analitos com consumo de solventes clorados relativamente menor. Além disso, observa-se neste ensaio ganho significativo na extração dos analitos, em comparação ao ensaio preliminar CLO:DCM:ACN, em que não foi empregado NaCl, evidenciando assim o efeito *salting out*. Além disso, boas recuperações foram observadas nos ensaios 9 e 13, cujas condições são próximas às empregadas no ensaio 15, indicando que esta região deve apresentar o melhor desempenho na extração dos analitos.

Objetivando-se a obtenção de modelos empíricos válidos próximos à região de máxima extração, foi realizada uma segunda modelagem empregando-se condições próximas às utilizadas no ensaio 15 da primeira modelagem.

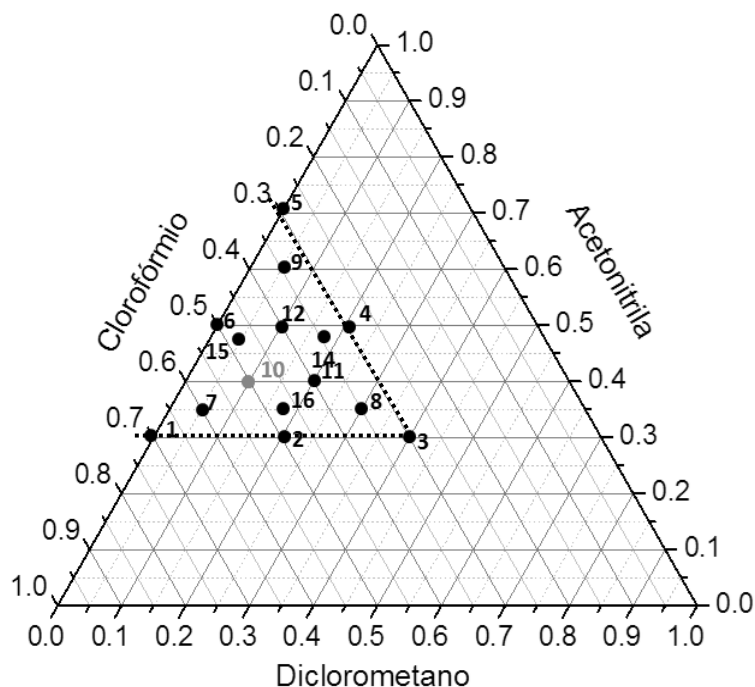
5.3.3.2. Modelagem 2

Nesta etapa foi realizada uma modelagem com restrições, sendo impostos limites inferiores e superiores para as proporções da mistura de solventes, a fim de avaliar detalhadamente a sub-região de melhor taxa de recuperação para os analitos. As condições empregadas neste planejamento estão descritas na Tabela 12 e na Figura 13.

TABELA 12: CONDIÇÕES ENSAIADAS NA MODELAGEM 2. MASSA TOTAL 1,5 g.

Ensaio	% (m:m:m)			Massa de solvente (g)			Volume de solvente (mL)		
	CLO	DCM	ACN	CLO	DCM	ACN	CLO	DCM	ACN
1	70	0	30	1,05	0,000	0,450	0,709	0,000	0,573
2	50	20	30	0,750	0,300	0,450	0,507	0,226	0,573
3	30	40	30	0,450	0,600	0,450	0,304	0,453	0,573
4	30	20	50	0,450	0,300	0,750	0,304	0,226	0,954
5	30	0	70	0,450	0,000	1,05	0,304	0,000	1,336
6	50	0	50	0,750	0,000	0,750	0,507	0,000	0,954
7	60	5	35	0,900	0,075	0,525	0,608	0,057	0,668
8	35	30	35	0,525	0,450	0,525	0,355	0,340	0,668
9	35	5	60	0,525	0,075	0,900	0,355	0,057	1,15
10	50	10	40	0,750	0,150	0,600	0,507	0,113	0,763
11	40	20	40	0,600	0,300	0,600	0,405	0,226	0,763
12	40	10	50	0,600	0,150	0,750	0,405	0,113	0,954
13	35	17,5	47,5	0,525	0,263	0,713	0,355	0,198	0,906
14	47,5	17,5	35	0,713	0,263	0,525	0,481	0,198	0,668
15	47,5	5	47,5	0,713	0,075	0,713	0,481	0,057	0,906

FIGURA 13. PROPORÇÕES EM MASSA EMPREGADAS NA MODELAGEM 2 COM RESTRIÇÃO DE LIMITES INFERIORES E SUPERIORES DOS SOLVENTES. O ENSAIO 10, DESTACADO EM VERMELHO, FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.



Como este planejamento trata-se de uma modelagem com restrições as composições da mistura foram codificadas a fim de facilitar a interpretação dos modelos matemáticos (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2010). Tal codificação foi realizada por meio da equação 13 (página 41).

Assim, com base nas restrições impostas na modelagem 2, por exemplo, (Figura 13) é possível verificar que a composição de CLO é restrita entre 30 % (limite inferior do CLO) e 70 % (limite superior do CLO), a de DCM entre 0 a 40 % e a de ACN de 30 a 70 % , logo:

$$\sum \text{limites inferiores} = 0,3 + 0 + 0,3 = 0,6 \quad (19)$$

portanto, o limite superior do CLO que é 70 %, ou seja, 0,70 passa a ser igual a 1:

$$CLO^* = \frac{CLO - \text{limite inferior de CLO}}{1 - \sum \text{limites inferiores}} = \frac{0,70 - 0,30}{1 - 0,60} = \frac{0,40}{0,40} = 1 \quad (20)$$

bem como o limite inferior de CLO passa ser zero:

$$CLO^* = \frac{CLO - \text{limite inferior de CLO}}{1 - \sum \text{limites inferiores}} = \frac{0,30 - 0,30}{1 - 0,60} = \frac{0}{0,40} = 0 \quad (21)$$

Assim, todas as composições do planejamento restrito foram codificadas, o que é realizado facilmente pelo software Statística 7.0, de modo que os modelos matemáticos passam a ser descritos em termos das pseudocomponentes x_i^* e não mais de x_i .

A Tabela 13 apresenta as respostas obtidas para os ensaios realizados na modelagem 2.

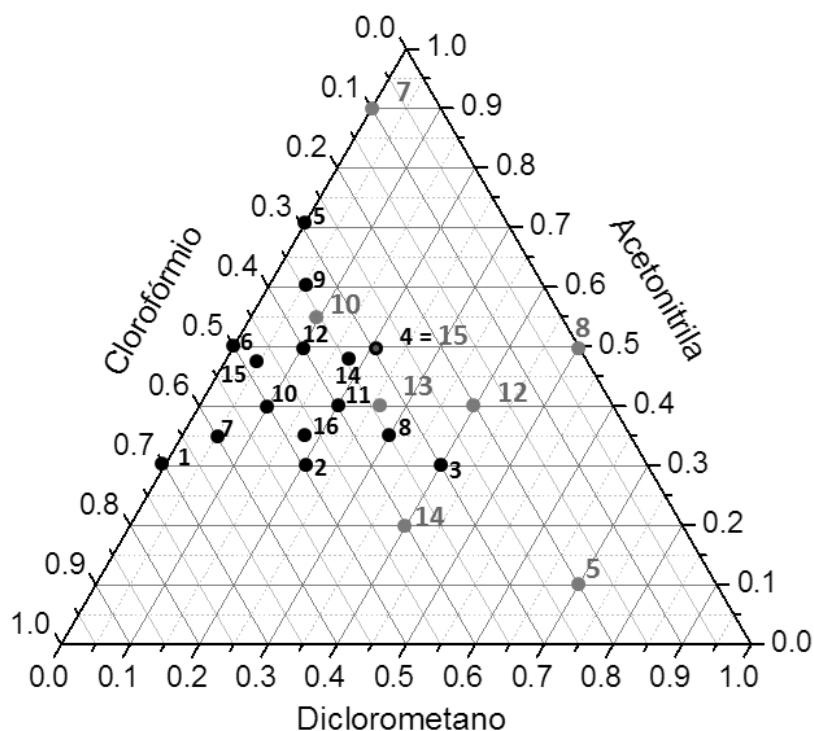
TABELA 13: RECUPERAÇÕES (%) OBTIDAS PARA OS ANALITOS NA SEGUNDA MODELAGEM DE MISTURA. O ENSAIO 10 FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.

Ensaio	DIA	DEA	ATZ	DIU	TFB
1	44,6	69,5	81,1	85,0	56,9
2	46,7	71,1	87,7	90,8	60,3
3	43,6	65,5	78,6	80,8	53,4
4	46,2	69,2	86,9	89,9	58,1
5	39,8	62,4	86,2	90,7	57,4
6	46,3	70,3	91,2	93,5	61,3
7	47,1	72,2	88,3	90,4	63,8
8	45,0	68,3	83,1	85,2	61,6
9	42,8	65,8	86,3	88,4	58,2
10	48,6 ± 0,651	73,9 ± 1,10	92,1 ± 1,79	95,6 ± 1,79	60,7 ± 1,50
11	41,9	62,7	77,8	80,4	54,7
12	48,8	73,9	92,7	97,3	61,1
13	45,4	69,3	87,2	90,6	58,8
14	47,2	71,8	89,2	91,3	55,5
15	48,1	73,3	92,4	96,2	74,0

A fim de verificar os efeitos dos fatores na recuperação dos analitos e a possibilidade de obtenção de modelos válidos, foram testados modelos lineares, quadráticos e cúbicos empregando-se ANOVA, considerando 95 % de confiança.

Apenas com os ensaios da modelagem 2 não foi possível obter uma superfície válida para o TFB, possivelmente devido ao reduzido número de experimentos realizados próximos à região de melhor recuperação deste analito. Logo, foram adicionados os resultados referentes aos ensaios 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14 e as replicatas do ensaio 15 da modelagem 1, para a obtenção de uma superfície de resposta válida, conforme a Figura 14. Ou seja, foram empregados 27 ensaios na construção deste modelo.

FIGURA 14. PROPORÇÕES EM MASSA EMPREGADAS PARA A OBTENÇÃO DO MODELO SIGNIFICATIVO PARA TFB. EM PRETO AS CONDIÇÕES DA MODELAGEM 2 E EM AZUL AS CONDIÇÕES REFERENTES AOS ENSAIOS 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14 E 15 DA MODELAGEM 1.



Dentre os modelos avaliados o que melhor representou a taxa de recuperação dos analitos em função das proporções dos solventes (extratores e dispersor) utilizados durante os procedimentos de extração foi o modelo quadrático, sendo os parâmetros das ANOVA apresentados na Tabela 14.

TABELA 14: ANOVA PARA OS MODELOS QUADRÁTICOS OBTIDOS PARA DIA, DEA, ATZ E DIU POR MODELAGEM DE MISTURA. MODELAGEM 2 COM RESTRIÇÕES.

Analito	Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média quadrática (MQ)	Teste F
DIA	Regressão (R)	72,8	5	14,6	4,23
	Resíduos (r)	37,8	11	3,45	
	Falta de ajuste (faj)	36,9	9	8,80	8,80
	Erro puro (ep)	0,932	2	1,00	
	Total	110,6	16		
% de variância explicada = 50,3					
% máxima de variância explicável = 65,8					
DEA	Regressão (R)	148,8	5	29,8	3,43
	Resíduos (r)	95,3	11	8,67	
	Falta de ajuste (faj)	92,9	9	10,32	8,61
	Erro puro (ep)	2,40	2	1,20	
	Total	244,1	16		
% de variância explicada = 43,2					
% máxima de variância explicável = 61,0					
ATZ	Regressão (R)	234,3	5	46,9	3,68
	Resíduos (r)	139,9	11	12,7	
	Falta de ajuste (faj)	133,5	9	14,9	4,64
	Erro puro (ep)	6,38	2	3,19	
	Total	374,2	16		
% de variância explicada = 45,6					
% máxima de variância explicável = 62,6					
DIU	Regressão (R)	260,5	5	52,1	3,23
	Resíduos (r)	177,2	11	16,1	
	Falta de ajuste (faj)	170,7	9	19,0	5,83
	Erro puro (ep)	6,50	2	3,25	
	Total	437,7	16		
% de variância explicada = 41,1					
% máxima de variância explicável = 59,5					
TFB	Regressão (R)	6026	5	1205	9,09
	Resíduos (r)	2785	21	132,6	
	Falta de ajuste (faj)	2061	16	162,6	4,41
	Erro puro (ep)	185	5	36,8	
	Total	8811	26		
% de variância explicada = 60,86					
% máxima de variância explicável = 68,39					

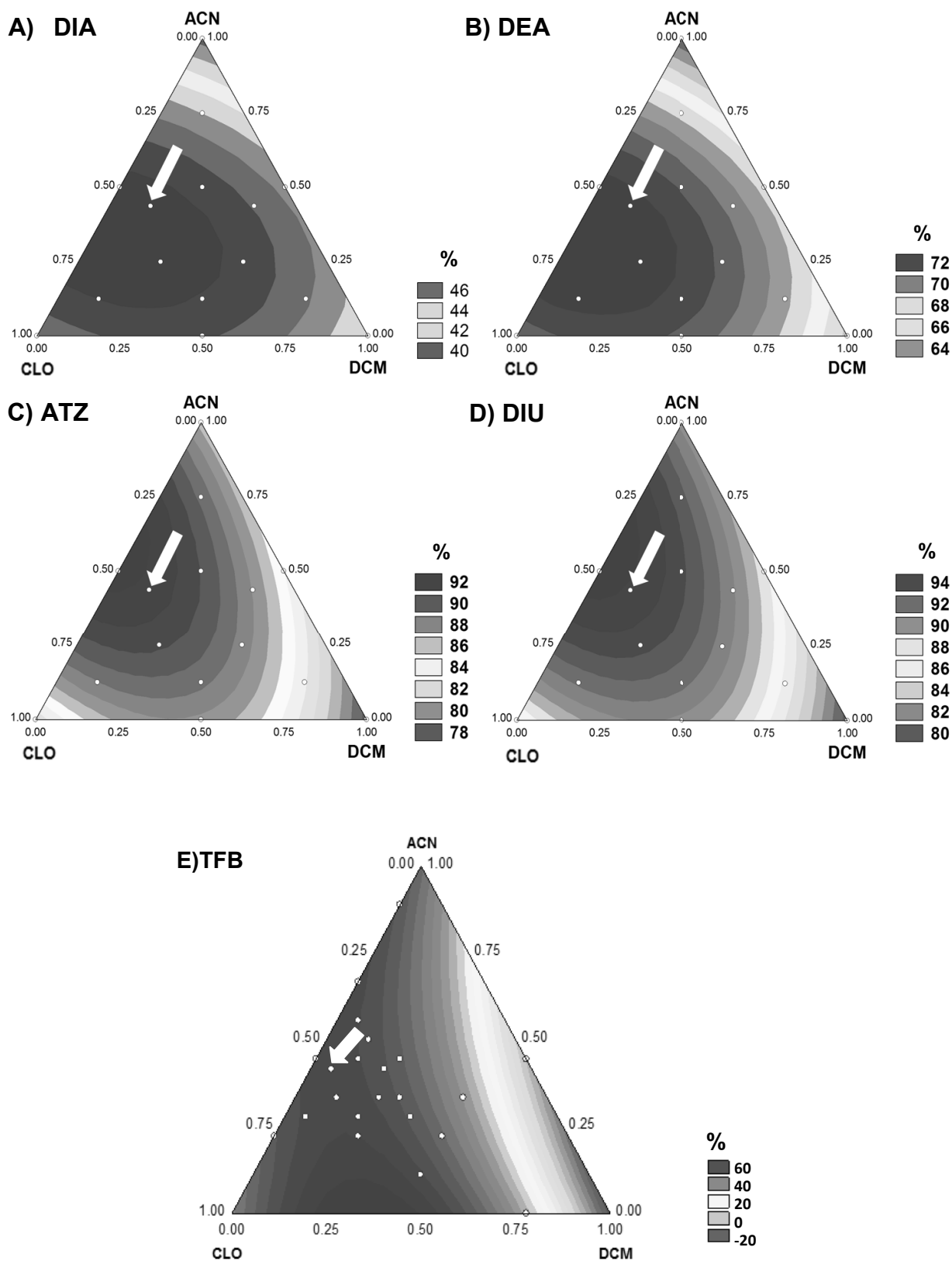
Os modelos exibiram porcentagem de variância explicada satisfatórias, levando em conta a porcentagem de máxima de variância explicável pelo modelo. Além disso, todas as regressões foram significativas com 95 % de confiança, uma vez que as razões MQ_R/MQ_r ($F_{calculado}$) foram superiores ao valor de $F_{tabelado}$. Para os modelos de DIA, DEA, ATZ, DIU considera-se o valor de $F_{v=5,11} = 3,11$ enquanto para o modelode TFB o valor tabelado é de $F_{v=5,21} = 2,68$. Ainda, não foi observada falta de ajuste em nenhum dos modelos, sendo MQ_{faj}/MQ_{ep} ($F_{falta\ de\ ajuste}$) inferiores a 19,32 ($F_{v=9,2}$) para os modelos obtidos para DIA, DEA, ATZ e DIU, e inferior a 4,604 ($F_{v=16,5}$) para TFB. Além disso, foram observados valores baixos e aleatórios para os

resíduos produzidos pelos modelos empíricos, confirmando a obtenção de modelagens adequadas.

Foram então construídas superfícies de resposta com base nos modelos quadráticos (Figura 15), que evidenciam a dependência da recuperação dos analitos com as diferentes proporções de solventes avaliadas. Vale ressaltar que as composições da mistura foram codificadas, de modo que nas superfícies apresentadas na Figura 15 a composição de cada solvente varia entre 0 e 1.

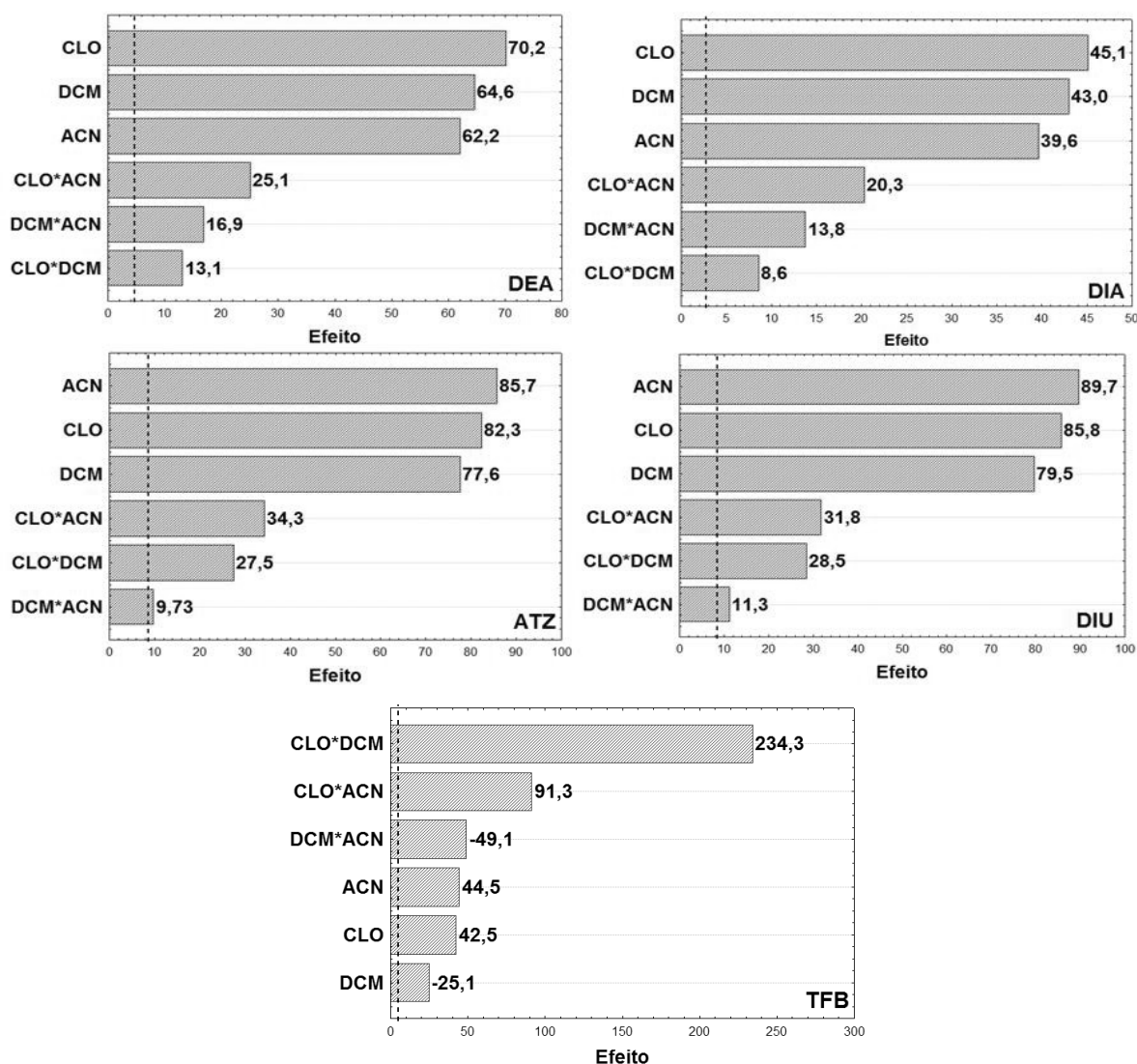
As cores quentes representam as maiores taxas de recuperação obtidas para os analitos, enquanto que cores frias correspondem a menores recuperações. Com isso é possível verificar a importância do emprego da mistura dos solventes extratores CLO:DCM na extração de DIA e DEA, sendo esta região a de melhor desempenho, fornecendo recuperações próximas a 46 % para DIA, 72 % para DEA, 92 % para ATZ, 94 % para DIU e de 60 % para o TFB.

FIGURA 15. CURVAS DE NÍVEL DO MODELO QUADRÁTICO PARA RECUPERAÇÃO (%) DOS ANALITOS EM FUNÇÃO DAS PROPORÇÕES DE SOLVENTE CLO:DCM:ACN. A) DIA; B) DEA; C) ATZ; D) DIU. AS SETAS BRANCAS INDICAM A MELHOR CONDIÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANALITOS.



Uma melhor avaliação dos efeitos pode ser realizada observando-se os gráficos de Pareto para os respectivos modelos quadráticos, apresentados na Figura 16. As linhas pontilhadas representam os valores da estimativa do desvio associado ao valor de t de student com 95 % de confiança ($t_{0,2} = 4,303$). Com base neste critério todos os efeitos principais e secundários foram significativos, sendo que a interação entre os fatores apresentou efeito sinérgico, melhorando a recuperação dos analitos.

FIGURA 16. GRÁFICOS DE PARETO PARA OS ANALITOS, OBTIDOS PARA OS MODELOS QUADRÁTICOS PARA DIA, DEA, ATZ E DIU.



Além disso, é possível perceber a importância do emprego do dispersor acetonitrila na resposta de todos os analitos, especialmente nos de polaridade intermediária (ATZ e DIU), em que este efeito foi o mais significativo. Sua principal

função é facilitar a extração dos analitos da fase aquosa para a orgânica imiscível. Ainda, o emprego do solvente extrator de maior polaridade, DCM, foi importante para todos os analitos, sendo mais sinérgico que a ACN para os analitos DIA e DEA, também de maior polaridade. Já para o TFB, o analito de menor polaridade, o emprego de DCM é antagônico a sua recuperação, como era de se esperar devido às distintas polaridades. O mesmo pode ser observado para o efeito de interação entre DCM*ACN. Assim, ao se reduzir significativamente a composição de DCM na mistura e elevando o teor de CLO e ACN, houve melhora significativa na recuperação deste analito, que passou de 64,3 % em média (30 %_{CLO} 20 %_{DCM} 50 %_{ACN}) para 74,0 % (47,5 %_{CLO} 5,0 %_{DCM} 47,5 %_{ACN}). Contudo, o efeito da mistura CLO*DCM foi sinérgico para o TFB, assim como para os outros analitos.

Considerando a codificação realizada, conforme descrito anteriormente, os modelos quadráticos obtidos para os analitos podem ser escritos na forma:

$$\begin{aligned} \text{recuperação}(\%) = & b_{CLO}^* CLO^* + b_{ACN}^* ACN^* + b_{DCM}^* DCM^* + b_{CLO \times ACN}^* CLO^* ACN^* \\ & + b_{CLO \times DCM}^* CLO^* DCM^* + b_{ACN \times DCM}^* ACN^* DCM^* \end{aligned} \quad (22)$$

sendo b_{xi}^* os valores dos efeitos da pseudocomponente xi^* apresentados nos gráficos de pareto para cada analito, ou seja, b_{CLO}^* é o valor do efeito da pseudocomponente CLO* na recuperação do analito.

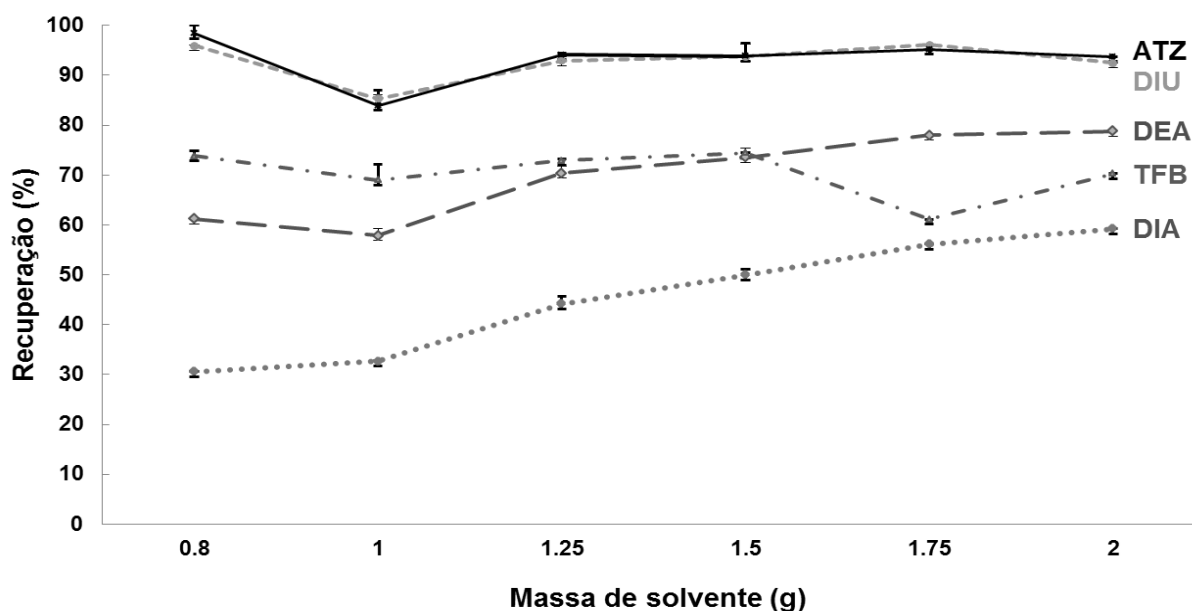
Por meio da sobreposição das superfícies de resposta, foi possível detectar a melhor proporção entre os solventes para a extração simultânea dos analitos, como sendo igual a 47,5 %_{CLO} 5,0 %_{DCM} 47,5 %_{ACN} (ponto 15 da modelagem 2) indicada pelas setas brancas na Figura 15 (página 72).

5.3.3.3. Avaliação da quantidade de solvente empregada

A influência da quantidade em massa da mistura dos solventes na recuperação dos analitos foi investigada na proporção de melhor desempenho obtida pela modelagem de misturas (47,5 %_{CLO}, 5,0 %_{DCM} e 47,5 %_{ACN}), sendo os ensaios realizados em triplicata (30 µg L⁻¹). As condições empregadas estão descritas na Tabela 15 e os resultados obtidos na Figura 17.

TABELA 15: CONDIÇÕES EMPREGADAS NA AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE SOLVENTE.

Massa total (g)	Massa de solvente (g)			Volume de solvente (mL)		
	CLO	DCM	ACN	CLO	DCM	ACN
0,800	0,380	0,040	0,380	0,257	0,030	0,483
1,000	0,475	0,050	0,475	0,321	0,038	0,604
1,250	0,594	0,063	0,594	0,401	0,047	0,755
1,500	0,713	0,075	0,713	0,481	0,057	0,906
1,750	0,831	0,088	0,831	0,562	0,066	1,06
2,000	0,950	0,100	0,950	0,642	0,075	1,21

FIGURA 17. AVALIAÇÃO DA MASSA TOTAL DE SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS POR DLLME (47,5 %_{CLO}, 5,0 %_{DCM} E 47,5 %_{ACN}).

Avaliando-se a Figura 17 é possível perceber que não houve grande diferença nas recuperações de ATZ, DIU e TFB com a variação da quantidade de solvente empregada, contudo menores massas da mistura de solventes reduziram significativamente a recuperação de DIA e DEA, o que limitou a possibilidade de se empregar volumes inferiores de solventes orgânicos clorados. Além disso, maiores quantidades não forneceram ganho apreciável nas taxas de recuperação, de modo que optou-se por manter a massa total em 1,50 g, ou seja, empregando-se 481 μL de CLO, 56,6 μL DCM e 906 μL ACN. Nestas condições a taxa de recuperação absoluta foi de $49,4 \pm 1,4 \%$ para DIA, $73,2 \pm 1,2 \%$ para DEA, $95,1 \pm 2,4 \%$ ATZ, $94,7 \pm 2,2 \%$ DIU e de $74,9 \pm 1,4 \%$ TFB.

5.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DLLME-LC-DAD E ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS

A validação do método DLLME-LC-DAD foi efetuada diretamente nas amostras reais, coletadas em três locais diferentes na bacia do rio Tibagi. O rio Tibagi possui 550 km de extensão e limita uma das 16 bacias hidrográficas do estado do Paraná, ocupando cerca de 13 % da área do estado (SEMA, 2010). A agricultura intensiva corresponde ao principal uso do solo desta bacia, especialmente nas regiões norte e sul, onde estão situadas cidades como Londrina, Castro e Ponta Grossa, em que as culturas como a do milho, da soja e do trigo são de grande importância econômica (SEMA, 2010). Estas culturas são as principais responsáveis pelo consumo de pesticidas no Paraná, e juntas consumiram mais de 70 % dos defensivos comercializados no estado entre 2013 e 2015 (SIAGRO). Logo o potencial de contaminação dos recursos hídricos nesta região é elevado, tornando essencial o monitoramento de pesticidas no ambiente.

Foram realizadas duas amostragens, em agosto de 2016 e em junho de 2017, tendo sido coletadas amostras de água de rio na cidade de Castro (rio Iapó e Nascente de rio em uma fazenda), e de água de lago em Ponta Grossa (lago Alagados, responsável pelo abastecimento da região). Nas amostras da primeira coleta foi realizada a validação do método de extração, avaliando-se os parâmetros de exatidão, precisão e robustez. Na segunda coleta foram avaliadas as curvas por superposição de matriz (matrix matched) nas amostras do rio Iapó e da Nascente.

A exatidão foi avaliada em termos de recuperação absoluta, em três níveis ($n=6$), e os resultados, com a respectiva estimativa do desvio padrão (s), estão mostrados na Tabela 16 (primeira coleta, agosto de 2016). O método apresentou recuperações satisfatórias para a maioria dos analitos ($> 70 \%$) em todos os pontos amostrados, com exceção do DIA que, como discutido anteriormente, apresenta uma menor recuperação devido a sua elevada polaridade.

TABELA 16: RESULTADOS DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA (INTER-DAY), REPETIBILIDADE (INTRA-DAY) E EXATIDÃO (RECUPERAÇÃO ABSOLUTA) PARA A ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS PELO MÉTODO DLLME-LC-DAD. COLETA 1 (AGOSTO 2016).

Amostra Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nascente			Rio Iapó			Lago Alagados		
		CV (%)		Recuperação $\pm s$ (%)	CV (%)		Recuperação $\pm s$ (%)	CV (%)		Recuperação $\pm s$ (%)
		Intra-day	Inter-day		Intra-day	Inter-day		Intra-day	Inter-day	
DIA	1,0	5	13	43±6	5	6	40±2	3	6	40±8
	100	2	4	49±2	3	3	51±2	4	5	48±2
	200	2	2	49±1	0,9	4	50±2	3	5	50±2
DEA	1,0	5	5	87±4	3	5	81±4	5	5	84±5
	50,0	3	6	81±5	2	4	79±3	3	2	82±2
	140	2	3	71±2	0,3	3	74±3	3	5	72±3
ATZ	2,0	2	4	87±4	3	8	88±7	3	3	95±3
	50,0	4	5	87±4	2	7	88±6	1	3	86±4
	100	3	3	86±3	0,6	4	90±4	4	4	89±4
DIU	2,0	3	2	93±2	3	9	89±8	2	8	101±8
	50,0	3	3	89±3	5	7	89±6	2	3	92±2
	100	1	3	89±3	0,5	4	92±4	4	6	92±5
TFB	4,0	3	11	67±7	12	14	73±9	3	10	77±6
	50,0	3	6	72±4	3	3	73±4	7	9	76±5
	100	3	4	71±7	3	6	65±7	4	8	74±4

Baixos valores de s foram obtidos, sendo que os maiores valores estão associados às concentrações mais baixas, ou seja, aquelas próximas aos valores de LOQ. Além disso, maiores desvios foram observados para o TFB, que elui na região de deriva da linha de base, devido ao aumento da composição de acetonitrila na fase móvel, o que pode implicar em maior imprecisão. Além disso, nessa região existe a possibilidade de eluição de interferentes apolares. No entanto, os valores de s ficaram dentro do limite ($<15\%$) estabelecido pela ANVISA (2003), bem como, não foi observado efeito de matriz significativo nas taxas de recuperação dos analitos. Isso pôde ser confirmado pela comparação estatística entre as médias de diferentes grupos, realizada pela ANOVA de fator único. A Tabela 17 apresenta os parâmetros obtidos pela ANOVA (95 % de confiança) para a comparação das recuperações dos analitos nas diferentes amostras da primeira coleta (Iapó, Nascente, Alagados e água ultrapura), fortificadas com $50,0\ \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=6$) de cada um dos analitos.

TABELA 17: PARÂMETROS OBTIDOS PELAS ANOVAS DE FATOR ÚNICO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ NOS DIFERENTES PONTOS DE COLETA. COLETA 1 (AGOSTO 2016)

Analito	Fonte de variação	SQ	ν	MQ	F
DIA	Entre grupos	28,9	3	9,64	2,89
	Dentro de grupos	66,7	20	3,33	
	Total	95,6	23		
DEA	Entre grupos	65,5	3	21,8	1,36
	Dentro de grupos	320,4	20	16,0	
	Total	385,9	23		
ATZ	Entre grupos	88,5	3	29,5	1,10
	Dentro de grupos	535,0	20	26,7	
	Total	623,4	23		
DIU	Entre grupos	71,7	3	23,9	1,02
	Dentro de grupos	469,6	20	23,5	
	Total	541,4	23		
TFB	Entre grupos	138,8	3	46,3	1,97
	Dentro de grupos	470,0	20	23,5	
	Total	608,8	23		

A partir dos resultados da ANOVA de fator único, compara-se o valor de F (dado pela razão entre a média quadrática (MQ) entre os grupos e a MQ dentro dos grupos), com o valor de $F_{\text{crítico}}$. Com 95 % de confiança e para os graus de liberdade 3 e 20, o $F_{\text{crítico}} = 3,098$. Assim, todos os valores de F obtidos são inferiores ao $F_{\text{crítico}}$, indicando que não existem diferenças significativas na recuperação dos analitos

entre as diferentes amostras coletadas. Logo, pode-se concluir que o método DLLME-LC-DAD não é suscetível ao efeito de matriz das amostras analisadas.

Esta ausência de efeito de matriz é um indício de que o método pode ser empregado com sucesso mesmo quando há uma variação no pH das amostras, uma vez que os valores de pH para as amostras reais coletadas no lapó (pH 6,70), na nascente (pH 6,43) e no Alagados (pH 6,75) são relativamente distintos.

A precisão do método foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de fortificação ($n=3$) nos três pontos de coleta das amostras reais, sendo os resultados também apresentados na Tabela 16. Foram obtidos baixos coeficientes de variação (CV) para todos os analitos nos testes de repetibilidade, não ultrapassando 12 %. Já para a precisão intermediária, avaliada em dias diferentes, maiores variações são esperadas, especialmente em concentrações mais baixas, próximas aos valores de LOQ, como pode ser observado para todos os analitos. Contudo, os valores de CV observados não foram superiores a 14 % para nenhum analito, valor relativamente baixo em análise de amostras ambientais. Além disso, todos os dados de CV estão dentro do limite de 15 % estabelecido pela ANVISA (2003).

A robustez do método foi investigada por meio do teste de Youden (INMETRO, 2016) aplicado à amostra do rio lapó fortificada com $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos analitos, sendo os efeitos dos fatores na recuperação apresentados na Tabela 18.

TABELA 18: EFEITOS OBTIDOS PARA OS SETE PARÂMETROS AVALIADOS PELO TESTE DE YOUTDEN.

Parâmetros		Efeito				
		DIA	DEA	ATZ	DIU	TFB
A/a	Vazão ($1,0-0,9 \text{ mL min}^{-1}$)	-3,57	-4,72	-5,97	-11,12	-6,78
B/b	T coluna ($40 - 42,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$)	-1,92	-2,98	-3,15	-0,56	-6,31
C/c	T secagem ($T_{\text{amb}} - 30^{\circ}\text{C}$)	3,05	5,89	8,14	3,10	-1,89
D/d	t agitação ($30 - 25\text{s}$)	-0,51	0,13	-2,50	-0,68	-0,42
E/e	t centrífuga ($6 - 5 \text{ min}$)	-3,04	-4,64	-4,74	-4,85	3,58
F/f	Velocidade de centrífuga ($4400- 4200 \text{ rpm}$)	0,08	0,14	2,15	1,19	4,83
G/g	NaCl ($10 - 9,5 \text{ \% m/v}$)	2,48	4,94	-9,49	-4,95	10,37
	s	1,67	3,37	5,96	6,40	4,1
	$s \times t_{(u=5; 95 \% \text{ de confiança})}$	4,29	8,66	15,3	16,5	10,5

A variação do tempo de agitação não promoveu grande efeito na recuperação dos analitos, evidenciando o rápido estabelecimento do equilíbrio, o que já é

esperado na DLLME. Contudo optou-se por manter a agitação em vortex uma vez que a simples adição da mistura de solventes com a micropipeta não apresentou resultados reprodutíveis em ensaios preliminares. A diminuição do tempo de centrifugação não foi eficiente em promover a completa separação, sendo observada uma fina camada de emulsão entre as duas fases, o que dificulta a coleta do extrato orgânico, logo o tempo foi fixado em 6 min. A secagem dos extratos a 30 °C reduziu o tempo necessário nesta etapa, sendo esta condição adotada no procedimento otimizado. Já a menor vazão teve efeito negativo na recuperação dos analitos devido ao alargamento significativo das bandas de eluição, contudo a alta precisão da bomba cromatográfica permite o controle rigoroso deste parâmetro.

Uma forma de avaliar estatisticamente os efeitos do teste de Youden é compará-los com a estimativa do desvio padrão (s), obtida pela precisão intermediária do método no mesmo nível de concentração, associada ao valor de t de student para o respectivo número de replicatas. Efeitos inferiores ao produto $s_x t$ não são considerados significativos no nível de confiança avaliado (HEYDEN *et al.*, 2001). Considerando o valor de t para sextuplicata com 95 % de confiança ($t_{v=5} = 2,571$), nenhum dos efeitos obtidos pelo teste de Youden foi significativo em comparação com a precisão *inter-day* (Tabela 18) estimada nas amostras do lapó ($50 \mu\text{g L}^{-1}$, $n=6$), de modo que o método pode ser considerado robusto às variações empregadas. Logo, com base nos resultados dos ensaios de validação, o método desenvolvido apresenta-se satisfatório para a determinação de todos os analitos.

Uma segunda amostragem realizada em junho de 2017 foi empregada para a construção de curvas por superposição de matriz. Estas curvas foram construídas nas amostras coletadas no rio lapó, na Nascente e em água ultrapura para fins comparativos. Não foram contruídas curvas com a amostra do Alagados, contudo foi avaliado, além da prova em branco, o nível de fortificação de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) tendo sido obtidas taxas de recuperação similares às das outras amostras desta coleta ($41,0 \pm 0,2$ % DIA, 74 ± 1 % DEA, 97 ± 1 % ATZ, 101 ± 1 % DIU, 78 ± 1 % TFB). A Tabela 19 apresenta os valores de recuperação obtidos na segunda coleta, em três diferentes níveis de fortificação ($5,00$; $50,0$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$; $n=3$). Estes valores foram estimados por meio das curvas de padronização externa obtidas empregando-se o método cromatográfico 2 (seção 5.2), em decorrência da troca de colunas do sistema cromatográfico.

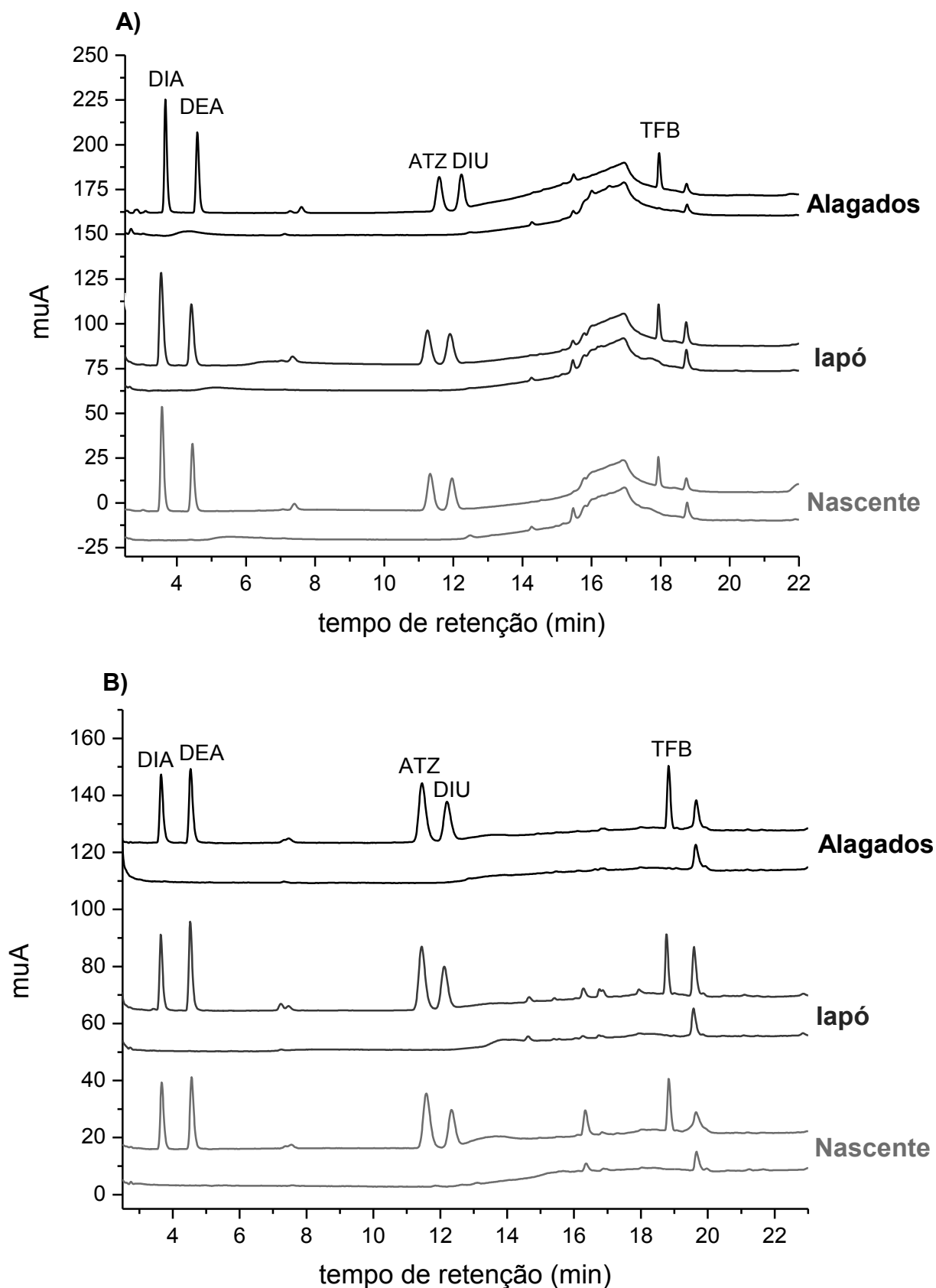
TABELA 19: RECUPERAÇÃO PARA OS ANALITOS NA SEGUNDA COLETA (JUNHO DE 2017).

Amostra Analito	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Iapó	Nascente	Ultrapura
		Recuperação $\pm s$ (%)*	Recuperação $\pm s$ (%)	Recuperação $\pm s$ (%)
DIA	5,00	40 \pm 1	38 \pm 1	42 \pm 2
	50,0	40 \pm 1	40 \pm 1	40 \pm 1
	100	41 \pm 1	41 \pm 1	40 \pm 1
DEA	5,00	81 \pm 3	77 \pm 3	78 \pm 1
	50,0	80 \pm 4	75 \pm 3	78 \pm 1
	100	80 \pm 1	77 \pm 1	77 \pm 2
ATZ	5,00	97 \pm 3	96 \pm 3	97 \pm 3
	50,0	94 \pm 3	93 \pm 1	95 \pm 3
	100	92 \pm 1	95 \pm 1	92 \pm 1
DIU	5,00	95 \pm 2	97 \pm 3	99 \pm 6
	50,0	101 \pm 3	100 \pm 1	102 \pm 1
	100	97 \pm 3	100 \pm 1	98 \pm 1
TFB	5,00	64 \pm 4	70 \pm 4	70 \pm 3
	50,0	73 \pm 1	71 \pm 2	73 \pm 1
	100	70 \pm 1	71 \pm 1	71 \pm 1

Assim como na primeira coleta, não foram observadas grandes diferenças na recuperação dos analitos entre as amostras. Ainda, os valores de s obtidos não ultrapassaram 6 %, estando abaixo de 15 % como recomendado pela ANVISA (2003).

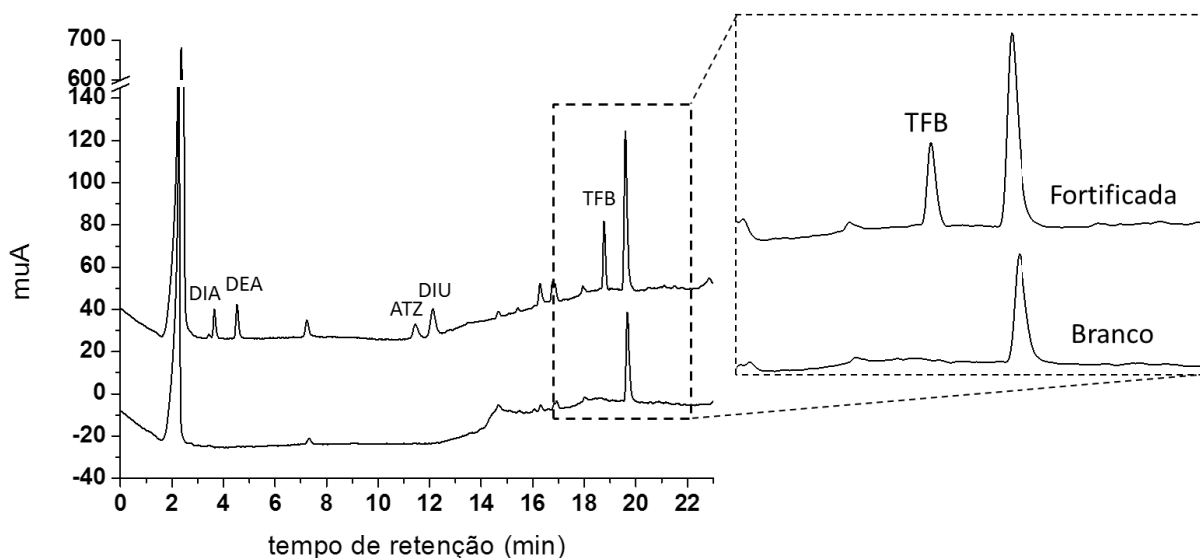
Apesar dos pontos de coleta estarem localizados em uma região de grande produção agrícola (especialmente de milho e soja, culturas em que o uso de ATZ, DIU e TFB é permitido no Brasil), na análise das amostras sem fortificação ($n=3$) não foi detectada a presença dos analitos em nenhum dos pontos amostrados, tanto na primeira quanto na segunda coleta, como pode ser verificado nos cromatogramas das amostras reais após a extração por DLLME (Figura 18). Além disso, a ausência de compostos eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos, na análise de todas as amostras sem fortificação, demonstra a adequada seletividade do método DLLME-LC-DAD desenvolvido.

FIGURA 18. CROMATOGRAMAS TÍPICOS DAS AMOSTRAS REAIS (215 nm) APÓS DLLME. A) COLETA 1 – PROVAS EM BRANCO E FORTIFICADAS COM $100 \mu\text{g L}^{-1}$ DE DIA E $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ DOS OUTROS ANALITOS; B) COLETA 2 – PROVAS EM BRANCO E FORTIFICADAS COM $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ DE CADA ANALITO.



A adequada seletividade do método cromatográfico pode ser evidenciada na Figura 19, em que é possível observar que apesar da presença de compostos eluindo próximos ao TFB, o pico apresenta-se bem resolvido, mesmo com monitoramento em 200 nm que é passível de absorção por muitos interferentes orgânicos presentes na amostra. Esta seletividade pôde ser confirmada para todos os analitos, por meio da avaliação da pureza dos picos cromatográficos, via comparação entre os espectros UV, gerados pelo DAD, das bandas de eluição dos analitos nos extratos e nos padrões puros. Vale ressaltar que as irregularidades na linha de base, melhor evidenciadas na ampliação da Figura 19, justificam os maiores valores de LOD e LOQ obtidos para este analito nas amostras reais, em comparação com água ultrapura (Tabela 20), uma vez que muitos interferentes da matriz podem eluir nesta região. Contudo a intensidade dessas bandas estão no limite do ruído e não tiveram efeito significativo na sensibilidade das curvas analíticas obtidas por superposição de matriz, como evidenciado nas Figuras 20 e 21.

FIGURA 19. CROMATOGRAMA TÍPICO DE AMOSTRA REAL (IAPÓ-COLETA 2) APÓS DLLME, ANÁLISE DA AMOSTRA SEM FORTIFICAÇÃO E AMOSTRA FORTIFICADA COM $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ DE CADA UM DOS ANALITOS. MÉTODO CROMATOGRÁFICO 2 E MONITORAMENTO EM 200 nm.



As Figuras 20 e 21 apresentam as curvas obtidas por superposição de matriz para cada analito após a DLLME, tanto nas amostras reais (Iapó e Nascente) quanto em água ultrapura, sendo os principais parâmetros de mérito analítico apresentados na Tabela 20.

FIGURA 20. CURVAS ANALÍTICAS (n=3) OBTIDAS POR MATRIX MATCHED EM ÁGUA ULTRAPURA (CÍRCULOS VERMELHOS) E NA NASCENTE (QUADRADOS PRETOS). A) DIA; B) DEA; C) ATZ; D) DIU; E) TFB.

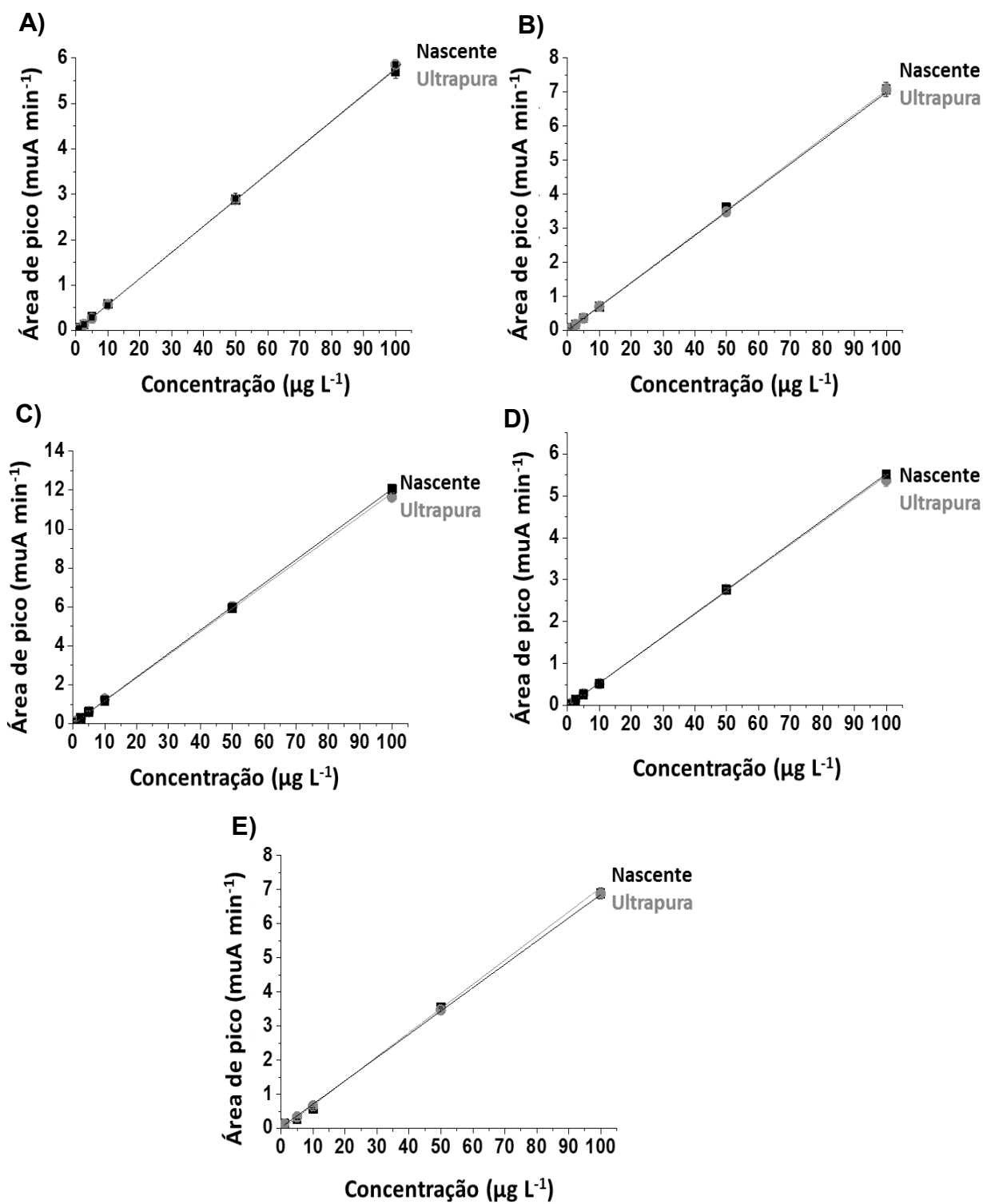


FIGURA 21. CURVAS ANALÍTICAS ($n=3$) OBTIDAS POR MATRIX MATCHED EM ÁGUA ULTRAPURA (CÍRCULOS VERMELHOS) E NO RIO IAPÓ (QUADRADOS PRETOS). A) DIA; B) DEA; C) ATZ; D) DIU; E) TFB.

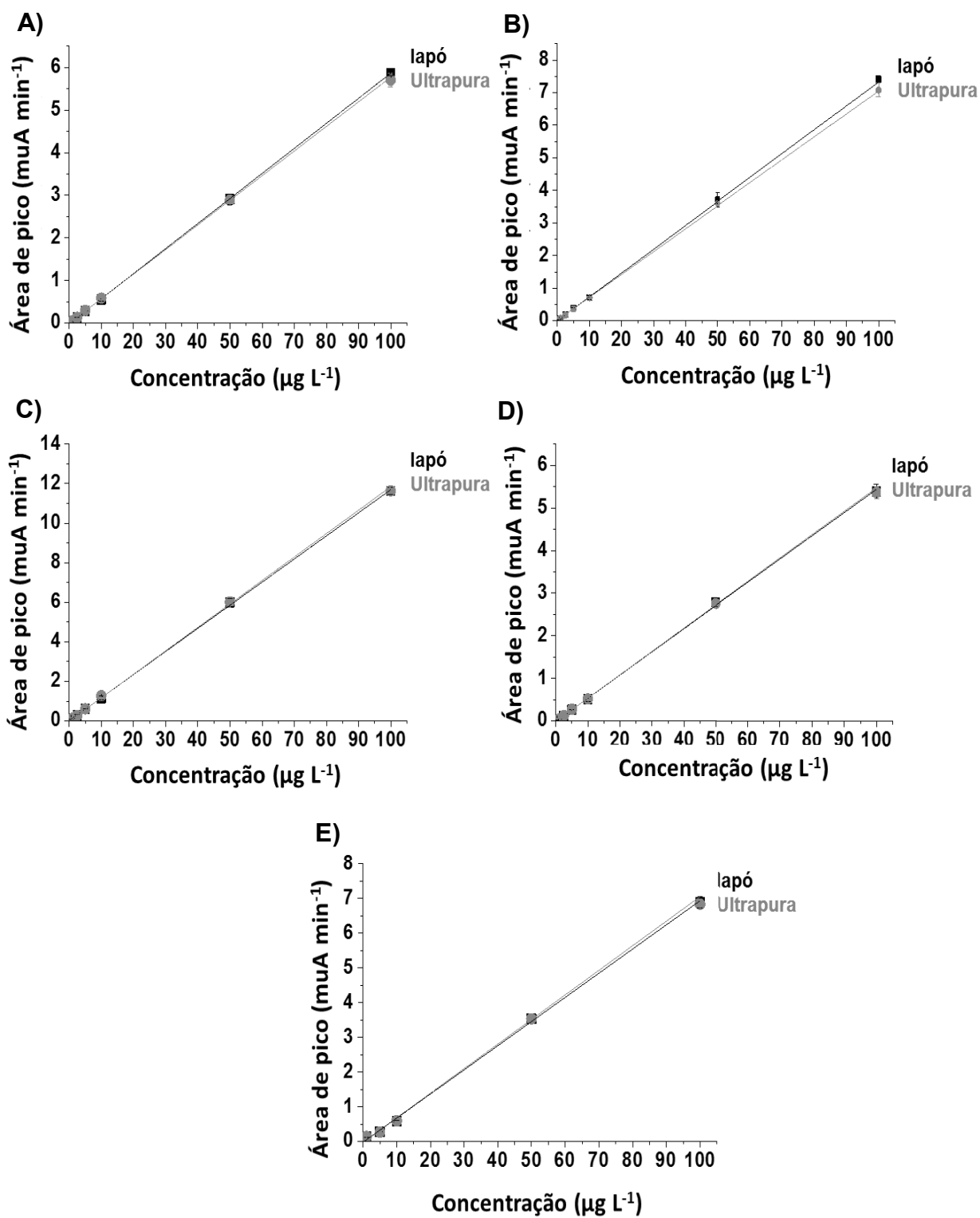


TABELA 20: PRINCIPAIS FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS POR SUPERPOSIÇÃO DE MATRIZ VIA DLLME-LC-DAD.

	Parâmetros	DIA (215 nm)	DEA (215 nm)	ATZ (223 nm)	DIU (254 nm)	TFB (200 nm)
Água ultrapura	Coefficiente Linear (a)	-0,00551	0,01338	-0,00703	-0,00967	-0,02317
	Coefficiente Angular (b)	0,05781	0,07237	0,11858	0,05489	0,07081
	Coefficiente de correlação (r)	0,9998	0,9992	0,9990	0,9999	0,9989
	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,50-100	0,50-100	0,50-100	0,50-100	2,50-100
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,015	0,042	0,062	0,13	0,36
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,049	0,14	0,21	0,45	1,2
Iapó	Coefficiente Linear (a)	-0,01346	0,000324	0,01208	-0,01032	-0,02023
	Coefficiente Angular (b)	0,05881	0,07537	0,11668	0,05454	0,06958
	Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9997	0,9998	0,9997	0,9946
	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,50-100	0,50-100	0,50-100	0,50-100	2,50-100
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,046	0,066	0,087	0,05	0,54
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,15	0,22	0,29	0,17	1,8
Nascente	Coefficiente Linear (a)	-0,00845	0,0078	-0,0071	-0,1168	0,03213
	Coefficiente Angular (b)	0,05786	0,07179	0,1207	0,05534	0,06824
	Coefficiente de correlação (r)	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999	0,9989
	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,50-100	0,50-100	0,50-100	0,50-100	5,0-100
	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,015	0,11	0,050	0,042	0,998
	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,051	0,368	0,168	0,14	3,3

Adequada linearidade ($r > 0,990$) (ANVISA, 2003) foi observada para todos os analitos. Além disso, não foram observadas grandes diferenças entre as curvas obtidas nas amostras reais e em água ultrapura, como pode ser evidenciado tanto nas Figuras 20 e 21 quanto na Tabela 20, confirmando mais uma vez que o método DLLME-LC-DAD não é vulnerável ao efeito de matriz para estas amostras.

Os níveis avaliados na construção das curvas por superposição de matriz foram escolhidos de modo que, considerando os respectivos FE (Tabela 21), fossem atingidas concentrações após a extração que abrangessem a faixa linear da padronização externa. Ainda as curvas foram estimadas apenas dentro da faixa linear, sendo as concentrações inferiores aos LOQ não empregadas na construção das curvas por superposição de matriz.

TABELA 21: PRINCIPAIS PARÂMETROS DE MÉRITO DO MÉTODO DLLME-LC-DAD PROPOSTO.

Analito	Recuperação absoluta $\pm s^*$ (%)	FE
DIA (215 nm)	49 \pm 1	9,8
DEA (215 nm)	73 \pm 1	14,6
ATZ (223 nm)	95 \pm 2	19
DIU (254 nm)	95 \pm 2	19
TFB (200 nm)	75 \pm 2	15

*s estimado para 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3)

Mesmo com os baixos fatores de enriquecimento (FE) fornecidos pelo método proposto (9,8 a 19), foram obtidos valores de LOD e LOQ semelhantes aos alcançados em métodos com elevado FE, como a extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) e a recuperação magnética associada a DLLME com líquido iônico (MR-IL-DLLME) na determinação de ATZ, DIA, DEA e TFB em águas naturais, como pode ser verificado na Tabela 22. Mesmo com a detecção por DAD, foram atingidos valores de LOQ semelhantes aos obtidos por GC-MS (associado a extração por SPE), técnica conhecidamente mais sensível, porém dispendiosa.

Os valores de LOQ obtidos para ATZ e DIU são inferiores aos limites estabelecidos pela legislação brasileira para águas de consumo (2,0 e 90,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente) (BRASIL, 2011; BRASIL, 2005). Além disso, o uso de cartuchos de SPE, bem como, líquidos iônicos nas extrações torna essas metodologias bastantes dispendiosas. Assim, o método proposto se mostra financeiramente viável, uma vez que os solventes empregados são de baixo custo, mesmo quando de alta pureza (grau cromatográfico). Ainda, apesar da alta toxicidade dos solventes orgânicos clorados, as quantidades empregadas no processo de extração são bastante inferiores as utilizadas em uma LLE convencional, o que reduz os possíveis impactos associados ao uso destas substâncias.

Além de ter se mostrado preciso, exato, robusto e não suscetível a efeito de matriz para as amostras analisadas, o método apresentou parâmetros de mérito analítico consistentes e comparáveis aos relatados na literatura. Assim, o método proposto mostra-se adequado e de baixo custo para a determinação dos analitos em matrizes aquosas naturais.

TABELA 22: COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS MÉTODOS.

Analito	Método	V _{amostra} (mL)	Faixa linear [*] (µg L ⁻¹)	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)	FE	Ref.
DIA			0,2-20	0,04	0,2	85,71-105,3	100	
DEA	SPE-GC-MS	100	0,2-20	0,05	0,2	90,17-109,68	100	MIN <i>et al.</i> , 2008
ATZ			0,2-20	0,02	0,2	88,36-92,21	100	
TFB	MR-IL-DLLME-LC-UV	10	1-300	0,07	1	90,5	302	ZHANG <i>et al.</i> , 2012
TFB	SPME-LC-DAD	20	0,10-200	0,03	0,10	70,9-101	179	MEI <i>et al.</i> , 2015
DIU	SUPRAS-LC-DAD	10	0,43-400	0,13	0,43	95 -104	48,5	SCHEEL e TARLEY, 2017
DIA			0,04-40	0,12	0,04	81,35-105,06		
DEA	SPE-LC-DAD	10	0,03-40	0,09	0,03	99,96-116,59	25	CAO <i>et al.</i> , 2017
ATZ			0,03-40	0,09	0,03	91,45-120,32		
DIA			0,50-100	0,015	0,049	49	9,8	
DEA			0,50-100	0,042	0,14	73	14,6	
ATZ	DLLME-LC-DAD	5	0,50-100	0,062	0,21	95	19	Método proposto
DIU			0,50-100	0,13	0,45	92	19	
TFB			2,50-100	0,36	1,2	75	15	

^{*}Faixa linear obtida por matrix matched.

MR-IL-DLLME: recuperação magnética associada a DLLME com líquido iônico (do inglês "Magnetic Retrieval of Ionic Liquid DLLME").

SUPRAS: Microextração baseada em solvente supramolecular (do inglês "Supramolecular Solvent-based Microextraction").

5.5. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HLLME

A fim de estabelecer uma rotina de HLLME a partir da DLLME previamente otimizada, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 preliminar, com triplicata do ponto central (PC), a fim de investigar a extração utilizando CLO e DCM isoladamente, na presença de ACN para a obtenção da fase única, bem como, avaliar a extração apenas com ACN. As condições ensaiadas com suas respectivas recuperações estão apresentadas na Tabela 23.

TABELA 23: RESULTADOS OBTIDOS PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 AVALIANDO OS EFEITOS DO VOLUME DE CLOROFÓRMIO, DICLOROMETANO E ACETONITRILA NA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.

Ensaio	Variáveis			Recuperação (%)				
	V _{ACN}	V _{CLO}	V _{DCM}	DIA	DEA	ATZ	DIU	TFB
1	-	-	-	34,3	36,7	41,5	46,8	41,5
2	+	-	-	88,1	99,4	80,8	89,5	78,0
3	-	+	-	36,3	42,6	53,4	58,3	53,4
4	+	+	-	77,5	80,4	78,1	90,3	72,2
5	-	-	+	40,7	46,0	54,6	62,6	54,5
6	+	-	+	63,6	59,5	59,2	70,1	60,9
7	-	+	+	27,2	35,5	47,2	46,0	50,8
8	+	+	+	77,0	74,4	78,1	89,5	115
Média do PC				54,3	45,4	66,7	60,0	62,7
S				1,5	0,70	2,3	1,7	1,8

Os volumes dos solventes clorados (Tabela 6, página 52) foram escolhidos de modo a minimizar a quantidade de ACN necessária para a obtenção de uma fase homogênea. A separação das fases foi realizada com base no efeito *salting out* a fim de garantir a obtenção do extrato orgânico imiscível na fase aquosa, mesmo quando empregado apenas acetonitrila como solvente de extração. Além de eficiente, este método de separação é bastante rápido e apresenta baixo custo.

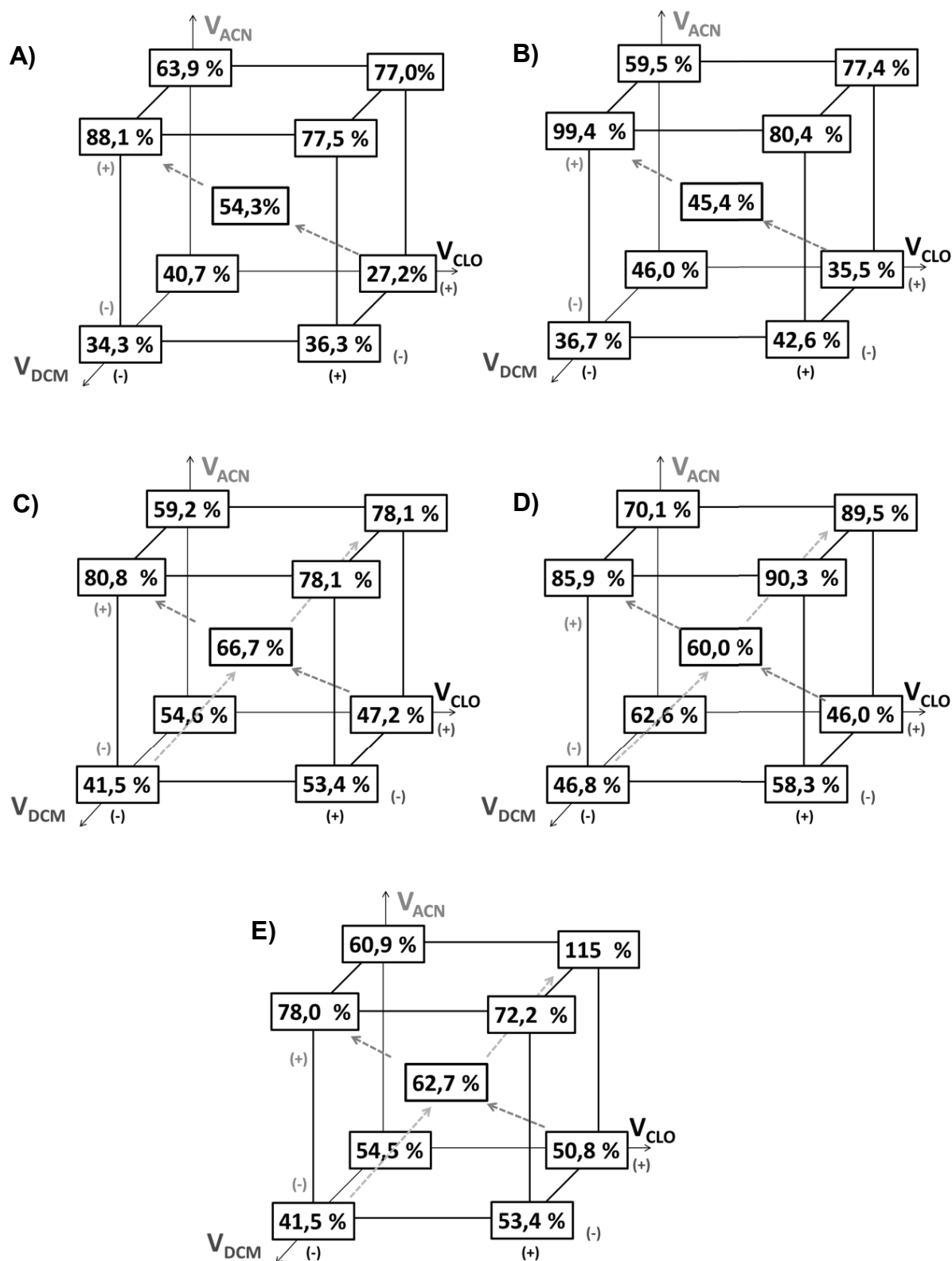
A fim de avaliar a influência dos fatores na resposta, foi realizado o cálculo dos efeitos do planejamento, cujos valores estão apresentados na Tabela 24.

TABELA 24: EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO 2³. OS VALORES EM NEGRITO SÃO SIGNIFICATIVOS COM 95 % DE CONFIANÇA.

Analito	s _x t	Efeitos						
		Principais			Interação			
		V _{ACN}	V _{CLO}	V _{DCM}	V _{ACN} xV _{CLO}	V _{ACN} xV _{DCM}	V _{CLO} xV _{DCM}	V _{CLO} xV _{DCM} xV _{ACN}
DIA	6,3	41,9	-2,14	-6,90	3,58	-5,59	2,10	9,89
DEA	3,0	38,2	-2,19	-10,9	0,137	-12,1	4,40	12,6
ATZ	9,9	24,8	5,16	-3,63	2,93	-7,12	0,589	10,4
DIU	7,5	31,4	3,80	-4,16	6,32	-5,94	-2,40	11,7
TFB	7,6	31,3	14,0	8,91	9,94	3,73	10,9	18,8

Os efeitos dos planejamentos fatoriais podem ser avaliados estatisticamente por meio da comparação com a estimativa do desvio padrão (s) do ponto central associada ao valor de t de student para o respectivo número de replicatas ($t_{v=2} = 4,303$) com 95 % de confiança. Assim os efeitos de interação terciária foram significativos para a determinação de todos os analitos, de modo que a avaliação do efeito do volume de cada um dos solventes não pode ser realizada individualmente. Para uma melhor visualização a Figura 22 apresenta a interpretação geométrica dos efeitos para cada analito.

FIGURA 22. INTERPRETAÇÕES GEOMÉTRICAS PARA: A) DIA, B) DEA, C) ATZ, D) DIU E E) TFB DOS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DO PLANEJAMENTO 2³. SETAS AZUIS E LARANJADAS INDICAM AS PRINCIPAIS TENDÊNCIAS OBSERVADAS NA VARIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.



De acordo com a Figura 22 há uma tendência de melhores recuperações no sentido do ensaio 2 para todos os analitos, conforme indicam as setas azuis, sugerindo que o emprego apenas de ACN pode ser viável para a extração simultânea dos compostos de interesse via HLLME. Já para o TFB, o analito mais apolar, outra tendência bem acentuada pode ser observada no sentido do ensaio 8 (setas alaranjadas), demonstrando que a presença dos solventes clorados pode ser eficaz na determinação de analitos de caráter apolar. No caso da ATZ e DIU, resultados similares e boas recuperações foram observados tanto no ensaio 2 (apenas ACN) quanto no 8 (ACN + DCM + CLO) ou 4 (ACN e CLO).

Vale ainda ressaltar que o ensaio 2 forneceu recuperações para DIA e DEA bastante superiores às obtidas pelo método DLLME otimizado anteriormente. Isto pode estar associado não apenas ao maior volume de ACN empregado, mas também ao uso do sulfato de magnésio para promover a separação das fases. Nas condições investigadas o emprego deste sal possibilitou quase que a completa expulsão da fase orgânica da aquosa, o que pode ter favorecido expressivamente a extração.

Foi então realizado um novo planejamento fatorial 2^3 empregando apenas acetonitrila como solvente de extração. Devido a troca da coluna e da pré-coluna, como já discutido, a quantificação das amostras deste segundo planejamento foi realizada com base nas curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico 2, conforme descrito no item 5.2.

Foram então avaliados o volume de acetonitrila (V_{ACN}), a quantidade de $MgSO_4$, bem como, o volume de amostra, a fim de reduzir a quantidade de reagentes e melhorar a pré-concentração dos analitos. O nível inferior do V_{ACN} (Tabela 7, página 53) escolhido para este planejamento foi de 1,25 mL, pois de acordo com ensaios preliminares, este foi o volume mínimo necessário para a obtenção de resultados precisos, devido à dificuldade de coleta do extrato orgânico na parte superior do tubo de extração. Além disso, menores volumes de solvente acarretavam na coleta de uma pequena porção da fase aquosa juntamente com o extrato orgânico, fato que dificultava a secagem dos extratos por fluxo de N_2 e promovia uma separação de fases na etapa de reconstituição na fase móvel, em decorrência do excesso de sal presente na porção da fase aquosa coletada, inviabilizando a quantificação das amostras.

Já a quantidade de sal foi avaliada em % m/v devido aos distintos volumes de amostra empregados no planejamento. O nível (-) foi estabelecido como sendo 30 % de MgSO_4 pois, de acordo com ensaios preliminares, este teor consistiu no mínimo necessário para a efetiva separação das fases. A Tabela 25 apresenta as taxas de recuperação obtidas neste planejamento.

TABELA 25: RESULTADOS OBTIDOS PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 AVALIANDO OS EFEITOS DO VOLUME DE ACETONITRILA, VOLUME DE AMOSTRA E TEOR DE SULFATO DE MAGNÉSIO NA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS.

Ensaio	Variáveis			Recuperação (%)				
	V_{ACN}	V_{AMOSTRA}	% MgSO_4	DIA	DEA	ATZ	DIU	TFB
1	-	-	-	51,4	86,8	65,9	96,6	64,5
2	+	-	-	65,2	80,8	84,5	97,5	47,1
3	-	+	-	58,1	72,8	84,0	96,6	46,3
4	+	+	-	67,4	108,4	88,9	105,4	72,3
5	-	-	+	67,8	83,1	91,5	96,7	49,6
6	+	-	+	69,8	88,7	81,2	100,5	112,3
7	-	+	+	64,3	83,7	81,2	96,0	77,8
8	+	+	+	66,6	84,1	81,5	95,0	49,7
Média do PC				60,0	77,1	84,6	96,4	55,5
s				2,3	2,6	1,6	2,9	5,2

A fim de avaliar a influência dos fatores estudados na recuperação dos analitos foi realizado o cálculo dos efeitos, e os resultados estão apresentados na Tabela 26.

TABELA 26: EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO 2^3 OTIMIZADO.

Analito	$s_{x,t}$	Efeitos						
		Principais			Interação			
		V_{ACN}	V_{AMOSTRA}	% MgSO_4	$V_{\text{ACN}} \times V_{\text{AMOSTRA}}$	$V_{\text{ACN}} \times \% \text{MgSO}_4$	$V_{\text{AMOSTRA}} \times \% \text{MgSO}_4$	$V_{\text{ACN}} \times V_{\text{AMOSTRA}} \times \% \text{MgSO}_4$
DIA	9,8	2,59	0,209	2,51	-0,381	-1,79	-1,47	0,459
DEA	11,3	1,59	0,432	-0,407	1,63	-1,05	-0,785	-2,09
ATZ	6,8	2,08	1,93	1,85	-0,496	-5,12	-4,94	3,71
DIU	12,6	1,61	0,224	-1,02	0,383	-0,888	-1,80	-1,63
TFB	22,5	1,67	-1,06	2,28	-1,83	1,00	-1,60	-5,17

Conforme a Tabela 26, com 95 % de confiança ($t_{v=2} = 4,303$), nenhum efeito foi significativo para a recuperação dos analitos nas amostras aquosas. Apesar do ensaio 6 ter fornecido recuperações elevadas para todos os analitos, neste ensaio foi empregada a maior quantidade de sal, além do menor volume de amostra (5,00 mL), limitando o fator de enriquecimento a 20 vezes. Assim, dentre as respostas

obtidas neste planejamento pode-se destacar as condições do ensaio 4, que apresentou boas recuperações para todos os analitos. Neste ensaio foi mantida a quantidade de sal no mínimo necessário para a separação das fases (30 %), bem como, foi utilizado o maior volume de amostra (10,0 mL), o que permite elevar o FE para 40 vezes. Ainda, apesar de não permitir reduzir ao mínimo a quantidade de solvente, ao empregar um volume relativamente grande (1,75 mL) facilita a coleta da fase orgânica na parte superior do tubo de extração, fornecendo assim melhores precisões.

Em todos os ensaios até então realizados para a otimização da HLLME houve uma grande dificuldade na secagem dos extratos orgânicos obtidos, sendo que o tempo necessário para esta etapa chegava a ser de algumas horas. Foram então realizados ensaios empregando-se 150, 200 e 300 mg de MgSO_4 para desidratar os extratos antes da secagem sob fluxo de N_2 . Estes ensaios foram efetuados em microtubos tipo eppendorf de 2 mL, sendo os extratos orgânicos obtidos após a HLLME (nas condições do ensaio 4 – planejamento 2) transferidos aos tubos contendo as diferentes quantidades de MgSO_4 , seguido de agitação em vórtex por 30 s e centrifugação por 3 min a 4400 rpm. Como resultado constatou-se que cerca de dois terços do volume do extrato era composto por água, uma vez que ocorria a separação da fase aquosa da orgânica (ACN). Assim, novos ensaios foram realizados utilizando-se 2,000 g de cloreto de sódio juntamente com o sulfato de magnésio na etapa do *salting out* da HLLME, empregando-se as condições do ensaio 4 (planejamento 2), que havia apresentado até então as melhores respostas. Nestes ensaios foi possível a secagem do extrato orgânico em menos de 15 min, evidenciando o aumento da força iônica adicional promovido pelo NaCl, e a consequente maior eficiência desta etapa do processo. Este efeito não ocorria pela adição de maiores quantidades do MgSO_4 devido ao seu limite de solubilidade no meio aquoso que é de 25,5 % m/v.

Embora o método HLLME não tenha sido extensivamente estudado neste trabalho, as etapas iniciais de otimização evidenciaram que as condições para obtenção de uma boa extração para os analitos estudados é muito similar a etapa de extração líquido-líquido realizada pelo método QuEChERS. Em função disto, as contribuições e/ou inovações que poderiam surgir desta vertente do trabalho ficaram muito limitadas, fato que associado ao limite de tempo para a conclusão do projeto, levou à interrupção desta etapa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A utilização da modelagem de misturas, para investigar a melhor composição entre os solventes extratores e o dispersor, foi bem-sucedida para a localização de uma condição de melhor desempenho para a extração simultânea das espécies de interesse via DLLME (481 μL de CLO, 56,6 μL DCM e 906 μL ACN). O emprego de dois solventes extratores melhorou a extração dos analitos mais polares (DIA e DEA), garantindo recuperações dentro da faixa aceitável (70-120 %) para a maioria dos analitos, com exceção do DIA, em que a recuperação foi de 48 % devido a sua elevada polaridade. Assim, foi possível estabelecer um método DLLME rápido, barato e sensível para a determinação simultânea de compostos com polaridades bastante distintas. Além disso, foram obtidos baixos valores de LOQ (0,049-1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$), comparáveis com outros métodos de extração como SPE, mesmo quando associados a sistemas de quantificação conhecidamente mais sensíveis como GC-MS.

O método DLLME-LC-DAD otimizado foi validado e aplicado com sucesso em amostras de águas naturais, coletadas em três diferentes pontos da bacia do rio Tibagi, situada no estado do Paraná-Brasil, apresentando precisão ($\text{CV} < 14 \%$) (ANVISA, 2003), exatidão e robustez adequadas, não tendo sido observado efeito de matriz significativo nas amostras analisadas. Além disso, apesar dos pontos de coleta estarem localizados em uma região de grande produção agrícola, não foi detectada a presença dos analitos em nenhum dos pontos amostrados, tanto na primeira (agosto 2016) quanto na segunda coleta (junho de 2017).

Ensaio preliminares para a otimização de um sistema homogêneo de extração apresentaram melhores recuperações para a maioria dos analitos empregando-se apenas acetonitrila como solvente extrator, seguida de uma etapa de partição líquido-líquido pela adição dos sais MgSO_4 (uma das etapas do método QuEChERS). A exceção ocorreu para o TFB, cuja recuperação foi mais elevada na presença dos solventes clorados, essencialmente devido ao menor caráter polar deste analito. Contudo, mesmo em condição desfavorável, uma taxa de recuperação em torno de 80 % foi obtida para TFB. Para este último caso, a etapa de extração dos analitos é realizada em acetonitrila, seguida de uma etapa de partição líquido-líquido pela adição dos sais MgSO_4 e NaCl .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, K.; LÄMSÄ, V.; REPONEN, P.; KÜBLBECK, J.; HONKAKOSKI, P.; MATTILA, S. Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. **Toxicology**, 294, 2012, p. 17-26.

ABRASCO. ASSOCIAÇÃO BARSILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê ABRASCO** - Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. 2012.

AMARAL, B.; ARAÚJO, J. A.; ZAMORA, P. G. P.; NAGATA, N. Simultaneous determination of atrazine and metabolites (DIA and DEA) in natural water by multivariate electronic spectroscopy. **Microchemical Journal**, 117, 2014, p. 262–267.

ANTHEMIDIS, A.N., IOANNOU, K.-I.G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid–liquid extraction for inorganic elements determination. A review. **Talanta**, 80, 2009, p. 413–421.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografias de Produtos Agrotóxicos**. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>, acesso em 28.09.2015.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003**. 2003, p. 1–15.

ARAÚJO, A. B.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M. C. M.; AMARAL, A. M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZAI, C. A. N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e saúde coletiva**, 12, 2007, p. 115-130.

ASSOUMANI, A.; MARGOUM, C.; CHATAING, S.; GUILLEMAIN, C.; COQUERY, M. Use of passive stir bar sorptive extraction as a simple integrative sampling technique of pesticides in freshwaters: Determination of sampling rates and lag-phases. **Journal of Chromatography A**, 1333, 2014, p. 1–8.

BARCELÓ, D.; HENNION, M.C. Trace determination of pesticides and their degradation products in water, techniques and instrumentation in analytical chemistry. **New York: Elsevier**, 1997, 19.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, 30, 2007, p. 651-666.

BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). **Chemosphere**, 90, 2013, p. 1860-1869.

BOULANOUAR, S.; MEZZACHE, S.; COMBÈS, A.; PICHON, V. Molecularly imprinted polymers for the determination of organophosphorus pesticides in complex samples. **Talanta**, 176, 2018, p. 465–478.

BOUSSAHEL, S.; BOULAND, S.; MOUSSAOUI, K. M.; BAUDU M.; MONTIEL, A. Determination of chlorinated pesticides in water by SPME/GC. **Water Ressearch**, 2002, 36, p. 1909-1911.

BRASIL. **Portaria MS nº 2914 de 12 de dezembro de 2011**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/771-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/vigilancia-da-qualidade-da-agua-vigiagua/l1-vigilancia-da-qualidade-da-agua-vigiagua/12539-legislacoes-e-portarias-vigiagua>>, acesso em 22.01.2017.

BRASIL. Resolução CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente nº, 357 de 17 de março de 2005**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, 32, 2010, p. 55-62.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostras para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, 34, 2011, p. 1604-1617.

CALIFORNIA DEPT, OF FOOD & AGRICULTURE. Center for Analytical Chemistry Environmental Monitoring, Section 3292, Meadowview Road Sacramento, CA. **Determination of Atrazine, Simazine, Diuron, Prometon, Bromacil, Prometryn, Hexazinone, Cyanazine, Metribuzin in River Water**. 1998, p. 1-11. Disponível em: <www.cdpr.ca.gov/docs/specproj/tribal/method151.pdf>, acesso em 10.09.2015.

CAO, W.; YANG, B.; QIA, F.; QIANA, L.; LIB, J.; LUC, L.; XUA, Q. Simple and sensitive determination of atrazine and its toxic metabolites in environmental water by carboxyl modified polyacrylonitrile nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, 1491, 2017, p. 16–26.

CARBO, L.; SOUZA, V.; DORES, E. F. G. C.; RIBEIRO, M. L. Determination of Pesticides Multiresidues in Shallow Groundwater in a Cotton-growing Region of Mato Grosso, Brazil. **Journal Brazilian Chemistry Society**, 00, 2008, p. 1111-1117.

CARMO, D. A.; CARMO, A. P. B.; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Ambi-Água**, 8, 2013, p. 133-143.

CATALANO, I.; SHADIA, M.; BAILEY, K. A.; CARDOSO, A. P. F.; REN, H.; FRY, R.C.; CAMARGO, J. L. V.; WOLF, D. C. Dose and temporal effects on gene expression profiles of urothelial cells from rats exposed to diuron. **Toxicology**, 325, 2014, p. 21-30.

CHOU, T.; LIN, S.; FUH, M. Determination of phenylurea herbicides in aqueous samples using partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. **Talanta**, 80, 2009, p. 493-498.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 15, 2005, p. 65-72.

CRAGIN, L. A.; KESNER, J. S.; BACHAND, A. M.; BARR, D. B.; MEADOWS, J. W.; KRIEG, E. F. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, 111, 8, 2011, p. 1293-1301.

DEB, G. Atrazine: A Case Study in the Differences Between Regulations of Endocrine Disrupting Chemicals in the EU and the US. **The Temple Journal of Science, Technology & Environmental Law**, 25, 2006, p. 173-190.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 18, 2014, p. 1296-1301.

DIL, E. A.; GHAEDI, M.; ASFARAM, A.; ZARE, F.; SADEGHFAR, F. Comparison between dispersive solid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction combined with spectrophotometric determination of malachite green in water samples based on ultrasound-assisted and preconcentration under multi-variable experimental design optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, 39, 2017, p. 374-383.

DORIVAL-GARCÍA, N.; JUNZAB, A.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BARRÓN, D.; NAVALÓNA, A. Simultaneous determination of quinolone and β -lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis. **Food Control**, 60, 2016, p. 382-393.

DUARTE, J. S.; DORES, E. F. G. C.; VILLA, R. D. Ultrasound vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USVADLLME) applied to the determination of the triazole flutriafol and triazines and triazones pesticides in water. **Química Nova**, 39, 2016, p.925-931.

EU. **Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998** - The quality of water intended for human consumption. OJL 330. 1998, p. 32-54.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Química Nova**, 21, 1998, p. 60-68.

FAO/WHO. **Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs**. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 81st meeting 2015. FAO JECFA Monographs 18. Residue Mography of Teflubenzuron. 2016. Disponível em: <<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=ja&uact=8&ved=0ahUKEwj65ZDZIP3UAhWII5AKHQE4CgIQFggxMAI&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2F3%2Fabp389e.pdf&usg=AFQjCNE9KwzHULLi9bnpTDIW1PNo3zqo5w>>, acesso em 09.07.2017.

FARAJZADEH, M. A.; BAHRAM, M.; ZORITA, S.; MEHR, B. G. Optimization and application of homogeneous liquid-liquid extraction in preconcentration of copper (II) in a ternary solvent system. **Journal of Hazardous Materials**, 30, 2009, p. 1535-1543.

FARAJZADEH, M. A.; KHOSH MARAM, L. Development of dispersive liquid-liquid microextraction technique using ternary solvents mixture followed by heating for the rapid and sensitive analysis of phthalate esters and di(2-ethylhexyl)adipate. **Journal of Chromatogray A**, 1379, 2015, p. 24–33.

FLORES, A. V.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; GOULART, S. M. Extração e análise de organoclorados em sedimento do ribeirão São Bartolomeu, Viçosa-MG. **Revista Analytica**, 3, 2004, p. 42-47.

FURTADO, I. M. A.; AMARAL, L. A.; PEREIRA, R.; FREGONESI, B. M. **Dinâmica da contaminação por diuron na bacia hidrográfica do córrego rico, Jaboticabal, SP**. ABRH, XVII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2007.

GAFFNEYA, V.J.; CARDOSO, V. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. M. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, 37, 2014, p. 138-149.

GURE, A.; LARA, F. J.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; MEGERSA, N.; DEL OLMO-IRUEL, M.. Vortex-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of sulfonylurea herbicides in wine samples by capillary high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, 170, 2015, p. 348-353.

HASE, Y.; TATSUNO, M.; NISHI, T.; KATAOKA, K.; KABE, Y.; YAMAGUSHI, Y. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 366, 2008, p. 66-72.

HEYDEN, Y. V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B. G. M.; MASSART, D. L. Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 24, 2001, p. 723–753.

HILTON, M. J; THOMAS, K. V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1015, 2003, p. 129-141.

HOSSEINIA, M. H.; REZAEAA, M.; AKBARIANB, S.; MIZANIC, F.; POURJAVIDA, M. R.; ARABIEHA, M. Homogeneous liquid–liquid microextraction via flotation assistance for rapid and efficient determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Analytica Chimica Acta**, 762, 2013, p. 54-60.

HROUZKOVÁ, S.; BRIŠOVÁ, M.; SZARKA, A. Development of fast, efficient and ecological method employing vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with fast gas chromatography–mass spectrometry for pesticide residues analysis in alcohol-content samples. **Journal of Chromatography A**, 1506, 2017, p. 18-26.

IBAMA. **Artigo 3º da Portaria Normativa nº 84**, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1996.

IBAMA. Consolidação de dados declarados pelas empresas registrantes em relatórios semestrais, conforme exigidos pelo **Art, 41 do Decreto nº 4,074/2002**. Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins – Histórico de vendas – 2000 a 2012. 2013.

IKEFUTI, C.V. **Hematologia e ecotoxicidade do teflubenzuron no controle de trichodina sp. em peixes**. 2012. 88 p. Dissertação (mestrado) - Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. 2012.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA E NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - DOQ-CGCRE-008, Revisão 05 – Agosto 2016**. 2016.

KIAROSTAMI, V.; ROUINI, M-R.; MOHAMMADIAN, R.; LAVASANI, H.; GHAZAGHI, M. Binary Solvents Dispersive Liquid—Liquid Microextraction (BS-DLLME) Method for Determination of Tramadol in Urine Using High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 22, 2014, p 1-8.

KOIFMAN, S.; HATAGIMA A. Disruptores endócrinos no ambiente: efeitos biológicos potenciais (Editorial). **Revista Brasileira de Mastologia**, 13, 2003, p. 9-11.

LOOS, R.; NIESSNER, R. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, 835, 1999, p. 217-229.

MACHADO, K. C.; GRASSI, M. T.; VIDAL, C.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F.; FERNANDES, A. N.; SODRÉ, F. F.; ALMEIDA, F. V.; SANTANA, J. S.; CANELA, M. C.; NUNES, C. R.; BICHINHO, K. M.; SEVERO, F. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **The Science of the Total Environment**, 572, 2016, p.138-146.

MADUREIRA, T. V.; ROCHA, M. J.; CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E. Development and optimization of LC-DAD method for the determination of diverse pharmaceuticals in estuarine surface waters. **Journal of Chromatographic Science**, 48, 2010, p. 176-182.

MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, 170, 2017, p. 22-35.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA/AGE. **Projeções do agronegócio de 2009/10 a 2019/2020**. Brasília: MAPA/AGE/ACS, 2010.

MARGOUM, C.; GUILLEMAIN, C.; YANG, X.; COQUERY, M. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty, **Talanta**, 116, 2013, p. 1-7.

MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, 4, 2012, p. 35-51.

MEI, M.; HUANG, X.; LIAO, K.; YUAN, D. Sensitive monitoring of benzoylurea insecticides in water and juice samples treated with multiple monolithic fiber solid-phase microextraction and liquid chromatographic analysis. **Analytica Chimica Acta**, 860, 2015, p. 29-36.

MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Otimização de um método de extração ultra-sônica e análise por CLAE para determinação de Diuron e seus metabólitos em solo de cultivo de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 30, 2009, p. 107-116.

MILHOME, M. A. L.; SOUZA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por

pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe-CE. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, 14, 2009, p. 363-372.

MIN, G.; WANG, S.; ZHU, H.; FANG, G.; ZHANG, Y. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Science of The Total Environment**, 396, 2008, p. 79-85.

MIRANDA, K.; CUNHA, M.; DORES, E.; CALHEIROS, D. F. Pesticide residues in river sediments from the Pantanal Wetland, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 43, 2008, p. 717-722.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B. L.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, 35, 2009, p. 803-814.

MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. C.; VIEIRA, S. N.; STRÜSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17, 2012, p. 57-1568.

MURATA, K.; YOKOYAMA, Y.; IKEDA, S. Extraction of Iron(III) Thenoyltrifluoroacetate by Propylene Carbonate. **Analytical Chemistry**, 44, 1972, p. 805-210.

NAGARAJU, D.; HUANG, S. D. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1161, 2007, p. 89-97.

NETO, B.B.; SCARMINIO, L. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora Bookman, 4ª ed., 2010.

NIST/SEMATECH. **e-Handbook of Statistical Methods**. Section 5.5.4.4. Constrained mixture designs. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri544.htm>>, acesso em 21.02.2017.

PACÁKOVÁ, V.; ŠTULÍK, K.; JISKRA, J. High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. **Journal of Chromatography A**, 754, 1996, p. 17-31.

PARA. PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS. **Relatório de atividades de 2011 e 2012**. Gerência-Geral de Toxicologia, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

PAYÁN, M.R.; LÓPEZ, M. A. B.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; NAVARRO, M. V.; MOCHÓN, M. C. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a

highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites. **Journal of Chromatography B**, 879, 2011, p. 197-204.

PINTO, M.I.; SONTAG, G.; BERNARDINO, R.J.; NORONHA, J.P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review, **Microchemical Journal**, 96, 2010, p. 225–237.

PPDB. **Pesticides Properties DataBase**, A to Z List of Pesticide Active Ingredients. University of Hertfordshire. Disponível em: <<http://sitem,herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/>>, acesso em 10.09.2015.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, 32, 2009, p.1620-1634.

PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; MARUBEA, L.C.; ESCARRONE, A. L. V. An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, 14, 2017, p. 1-18.

ROCHA, A. A.; MONTEIRO, S.H.; ANDRADE, G. C. R. M.; VILCA, F. Z.; TORNISIELO, V. L. Monitoring of Pesticide Residues in Surface and Subsurface Waters, Sediments, and Fish in Center-Pivot Irrigation Areas. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26, 2015, p. 2269-2278.

RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Multi-residue analytical methods for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216, 2009, p. 2958-2969.

ROJAS R. A.; OJEDA, B. M. E.; BARRAZA, O. X. Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. **Revista médica de Chile**, 128, 2000, p. 399-404.

SAGLIO, P., TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 35, 2004, p.484-491.

SANTOS, L. F. S.; SOUZA, N. R. S; FERREIRA, J. A.; NAVICKIENE, S. A reversed-phase high performance liquid chromatography method combined with matrix solid-phase dispersion extraction for the determination of teflubenzuron, lefenuron e bifenthrin in lyophilized coconut water. **Journal of Food Composition and Analysis**, 26, 2012, p.183–188.

SCHEEL, G. L.; TARLEY, C. R. T. Feasibility of supramolecular solvent-based microextraction for simultaneous preconcentration of herbicides from natural waters

with posterior determination by HPLC-DAD. **Microchemical Journal**, 133, 2017, p.650–657.

SCHUYTEMA, G. S.; NEBEKER, A. V. Comparative toxicity of diuron survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and africa clawed frog embryos and tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 34, 2004, p. 370-376.

SEMA. Bacias Hidrográficas do Paraná: Série Histórica. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos-SEMA/Paraná. **Revista Bacias Hidrográficas do Paraná**, Primeira edição, 2010.

SEPA. SCOTTISH ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY. Fish Farming Advisory Group. **Calicide (Teflubenzuron)** - Authorisation for use as an infed sea lice treatment in marine cage salmon farms. Risk Assessment, EQS and Recommendations Dir Env Strategy, Policies, SEPA, Policy N° 29, 1999.

SERON, L. H. **Extração Líquido-Líquido por Fase Única** - Estudo no Sistema Água-Etanol-Clorofórmio com 8-Hidróxiquinolina e Al, Fe, Cu e Zn. 1981. 102 p. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química de Campinas, Unicamp, Campinas, 1981.

SERVIER MEDICAL ART. **Powerpoint image bank**. Chemistry and Lab apparatus. Disponível em: < <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>>, acesso em 29.06.17

SIAGRO. SISTEMA DE MONITORAMENTO DO COMÉRCIO E USO DE AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ. Dados do Comércio de Agrotóxicos no Paraná. Disponível em: < <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=105?>>, acesso em 27.06.17.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, 34, 2011, p. 665-676.

SIMPKINS, J. W.; SWEMBERG, J. A.; WEISS, N.; BRUSICK, D.; ELDRIDGE, J. C.; STEVENS, J. T. Atrazine and breast cancer: a framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence. **Toxicological Sciences**, 123, 2011, p. 441-459.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas; **Anais do Workshop**: Mercado Brasileiro de Fitossanitários; Avaliação da Exposição de Misturadores, Abastecedores e Aplicadores de Agrotóxicos, 2009.

STUART, M.; LAPOWORTH, D.; CRANE, E.; HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of The Total Environment**, 416, 2012, p. 1-21.

TORBATI, M.; FARAJZADEH, M.A.; TORBATI, M.; NABIL, A.A.A.; MOHEBBI, A.; Afshar Mogaddam, M.R. Development of salt and pH-induced solidified floating organic droplets homogeneous liquid-liquid microextraction for extraction of ten pyrethroid insecticides in fresh fruits and fruit juices followed by gas chromatography-mass spectrometry, **Talanta**, 176, 2018, p. 565-572.

TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J.; ROCÍO-BAUTISTA, P.; PINO, V.; AFONSO, A. M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, 51, 2013, p. 87-106.

TYGEL, A. Aumenta a quantidade de agrotóxicos consumido por cada brasileiro: 7,3 litros. **Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO)**, 2015, Disponível em: <<http://www.abrasco.org.br/site/2015/04/aumenta-a-quantidade-de-agrotoxicos-consumido-por-cada-brasileiro-73-litros/>>, acesso em 25.09.2015.

VALICENTE, I. C. F. H.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M. Risco Potencial das Pragas de Milho e de Sorgo no Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013.

WANG, X.; WANG, Y.; ZOU, X.; CAO, Y. Improved DLLME based on solidification of floating organic droplet method with a binary mixed solvent applied for determination of nicotine and cotinine in urine. **Analytical Methods**, 6, 2014, p. 2384-2389.

WANG, Z.; HU, J.; DU, H.; HE, S.; LI, Q.; ZHANG, H. Microwave-assisted ionic liquid homogeneous liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in *Rheum palmatum* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 125, 2016, 178-185.

XU, X.; YE, J.; NIE, J.; LI, Z.; LEEB, M. A new liquid-liquid microextraction method by ultrasound assisted salting out for determination of triazole pesticides in water samples coupled by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, 7, 2015, p. 1194-1199.

YOON, J. Y.; PARK, J. H.; HAN, Y.; LEE, K. Residue patterns of buprofezin and teflubenzuron in treated peaches. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, 1, 2012, p.10-14.

ZHANG, J.; LI, M.; YANG, M.; PENG, B.; LI, Y.; ZHOU, W.; GAO, H.; LU, R. Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, 1254, 2012, p. 23-29.